

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**



**TESIS DOCTORAL**

**Nanosistemas quitosano/albúmina dirigidos a  
receptores de folato para la vehiculización de la  
doxorubicina en la terapia del cáncer**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

**Nuria Montero Pastor**

DIRECTORAS

**María Dolores Blanco Gaitán**  
**Rosa María Olmo López**

**Madrid, 2018**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular**



**NANOSISTEMAS QUITOSANO/ALBÚMINA DIRIGIDOS A  
RECEPTORES DE FOLATO PARA LA VEHICULIZACIÓN DE LA  
DOXORRUBICINA EN LA TERAPIA DEL CÁNCER**

**Tesis doctoral** que, para optar al grado de Doctora en Bioquímica presenta

**Dña. Nuria Montero Pastor**

Madrid, 2017



# UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

## FACULTAD DE MEDICINA

### Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

**M<sup>a</sup> Dolores Blanco Gaitán**, Profesora Titular de Bioquímica y Biología Molecular en la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, **Rosa M<sup>a</sup> Olmo López**, Profesora Titular de Bioquímica y Biología Molecular en la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, y **César Teijón López**, Profesor Titular de Enfermería en la Facultad de Enfermería de la Universidad Complutense de Madrid.

#### CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral que lleva por título “Nanosistemas quitosano/albúmina dirigidos a receptores de folato para la vehiculización de la doxorubicina en la terapia del cáncer”, realizada por la licenciada **Nuria Montero Pastor** bajo nuestra dirección, reúne todos y cada uno de los requisitos necesarios para optar al grado de Doctor en Bioquímica.

Y para que así conste a los efectos oportunos firmamos el presente en Madrid a 13 de marzo de 2017.

M<sup>a</sup> Dolores Blanco Gaitán

Rosa M<sup>a</sup> Olmo López

César Teijón López





***A mi familia***

*“We are part of you, invisible to anyone else”*

*J.K. Rowling, H.P. and the Deathly Hallows*



## Agradecimientos

*Dicen que el agradecimiento es la memoria del corazón, y es por eso por lo que ahora, en el fin de esta etapa, quiero detenerme a agradecer a toda la gente que me ha acompañado y ha hecho posible este trabajo.*

*Para ello me gustaría comenzar agradeciendo a mis directores de tesis, a la Dra. Maria Dolores Blanco, directora del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, por haberme permitido realizar este trabajo en dicho departamento, también me gustaría agradecerle su acogida, sus esfuerzos y su comprensión en todo momento. A la Dra. Rosa María Olmo, por su ayuda en la realización de este trabajo, por su ayuda en este último empujón donde yo no veía el fin y por su forma vitalista de entender las cosas. Al Dr. César Teijón, por su presencia, ayuda y amabilidad. A los tres, gracias por haberme acompañado en este tramo de mi vida, fundamental para mi.*

*También me gustaría agradecer al Dr. Jose María Teijón Rivera, Excelentísimo Académico, su apoyo, su permanente disponibilidad y sus palabras, tanto de ánimo como de bromas, siempre dispuesto a hacerte sentir bien.*

*Así mismo, me gustaría dar las gracias a Inés, Cynthia y Maria Ángeles, por su cariño, sus ánimos y su colaboración en mi proyecto. También me gustaría agradecer a toda la gente del Departamento de Bioquímica que en algún momento se ha preocupado por mi trabajo, ofreciéndome ayuda y palabras de ánimo.*

*Gracias a mis compañeras, entrar a formar parte de algo nuevo siempre es difícil, sin embargo, vosotras facilitasteis ese proceso que pasó casi sin darme cuenta. A Ana y a Sandra, porque aunque no hemos tenido la oportunidad de pasar todos los ratos que me gustaría, siempre han sido buenos. A Anita, por tu forma de trabajar, tu eficiencia y tu preocupación por mi trabajo, a Marta por ser una de las personas más alegres que conozco y que más alegría transmite y por toda tu ayuda en células; si no es por ti, sigo con el paraformaldehído. A Elena, por haberme acompañado de la mano, por enseñarme y, sobre todo, por transmitirme ese espíritu de esfuerzo incansable por lograr tus objetivos.*

*Me gustaría agradecer a mis compañeros del departamento, los que no han compartido conmigo laboratorio pero sí son tan responsables de este trabajo como si lo hubiesen hecho. A Yannick por sus apariciones silenciosas y esa forma de ser especial, a Pilar*

*por su sinceridad y por sus muy diferentes gustos a los míos, a Ángel, por todos los debates y, sobre todo, por sus ganas de ayudar y su empeño de tener siempre una sonrisa y sacársela a los demás. A Vero, por ser un ejemplo, como persona, como trabajadora y como madre (y en expresiones raras). Gracias a Ana, por tu amistad, no sabes cuánto la valoro y cuánto me alegro de todos los ratos juntas. A Carmen, en tres años podría agradecerte muchas cosas, pero sólo me gustaría decir que en cada laboratorio (en cada trabajo) del mundo debería existir alguien como tu. A todos vosotros, gracias por todos los buenos ratos, las muchas risas y las horas de conversaciones, han sido la gasolina para terminar este proyecto.*

*También me gustaría agradecer a los que no están relacionados directamente con este proyecto científico pero sin los que no habría sido posible.*

*A mis VIP de Riaza, aunque somos demasiadas y sería difícil escribir el nombre de todas y lo que os hace a cada una única e irremplazable, me gustaría agradecerlos los ánimos, el cariño y los años juntas. A Nuria y a Andrea, por vuestra personalidad única y vuestra compañía, por soportar mis ausencias y por escucharme en todo momento, gracias por dejarme formar parte de vuestras vidas.*

*También me gustaría dar las gracias a mis bioquímicas, Irene, Eugenia, Ana y Alicia, ya sólo por conocerlos mereció la pena el abandono de la química pura. Ali, gracias por todos tus esfuerzos por abrirme otros caminos.*

*A mis químicas, a Paula, por su permanencia a lo largo de los años. A Teresa, por tu optimismo y tu locura, eres única. A María, por ser una luchadora, por llevarme siempre la contraria pero estar siempre ahí. A Ana Rodríguez (¡Ay Galán!) por tu cariño y tu forma de ayudarme a crecer como persona.*

*A mi familia. A mis abuelos, Secundino y Antonia, porque todo lo bueno que hay en mí se lo debo a ellos. A mi tío, por estar orgulloso de mí y hacérmelo saber, yo también lo estoy de ti. A mi padre, Julián, por ser el consecuidor, a mi madre, Antonia, por ser la constante de mi vida, a mi hermana, por ser igual que yo, por ser distinta a mí pero sobre todo, por estar siempre conmigo. Se me quedan cortas unas líneas para deciros todo lo que os quiero, os valoro y os necesito.*

*A todos, aunque espero demostrároslo todos los días, gracias.*

Si para recobrar lo recobrado  
Debí perder primero lo perdido,  
Si para conseguir lo conseguido  
Tuve que soportar lo soportado,  
Si para estar ahora enamorado  
Fue menester haber estado herido,  
Tengo por bien sufrido lo sufrido,  
Tengo por bien llorado lo llorado.  
Porque después de todo he comprobado  
Que no se goza bien de lo gozado  
Sino después de haberlo padecido.  
Porque después de todo he comprendido  
Por lo que el árbol tiene de florido  
Vive de lo que tiene sepultado

Francisco Luis Bernárdez



# Índice

Abstract .....	25
Resumen.....	33
Abreviaturas .....	41
Introducción .....	45
1. CÁNCER .....	47
1.1 El cáncer y su incidencia.....	47
1.2 Características fisiológicas de los tumores sólidos .....	49
1.2.1 Cáncer de mama.....	53
1.2.2 Cáncer de ovario.....	53
1.2.3 Cáncer colorrectal .....	54
1.3 Tratamientos actuales del cáncer.....	54
1.3.1 Cirugía.....	55
1.3.2 Radioterapia .....	55
1.3.3 Quimioterapia.....	56
1.4 Doxorrubicina .....	59
2. NANOMEDICINA.....	62
2.1 Liberación controlada de fármacos .....	64
2.2 Sistemas nanométricos de liberación controlada .....	66
2.2.1 Dendrímeros.....	66
2.2.2 Liposomas.....	67
2.2.3 Quantum dots.....	69
2.2.4 Nanotubos de carbono.....	69
2.2.5 Nanopartículas sólidas.....	70
2.3 Nanopartículas en el tratamiento del cáncer .....	71



2.4	Vectorización de las nanopartículas .....	73
2.4.1	Vectorización pasiva de las nanopartículas.....	73
2.4.1.1	Vectorización activa de las nanopartículas .....	74
2.4.1.2	Anticuerpos .....	74
2.4.1.3	Factor epidérmico de crecimiento humano 2 (receptor HER2).....	75
2.4.1.4	Receptor de transferrina (TfR) .....	75
2.4.1.5	Antígeno de membrana específico de próstata (PSMA).....	76
2.4.1.6	Aptámeros.....	76
2.4.1.7	Ácido fólico.....	77
3.	BIOMATERIALES .....	79
3.1	Polímeros de origen natural .....	80
3.1.1	Polisacáridos.....	80
3.1.2	Polímeros de naturaleza proteica .....	85
	Objetivos .....	89
1.	OBJETIVOS .....	91
	Materiales y Métodos .....	93
1.	SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS .....	95
1.1	Síntesis de nanopartículas no funcionalizadas .....	95
1.2	Síntesis de las nanopartículas funcionalizadas con ácido fólico.....	96
1.2.1	Activación del ácido fólico .....	97
1.2.2	Unión del NHS-folato a las nanopartículas.....	97
1.2.3	Cuantificación del ácido fólico unido a las nanopartículas .....	98
2.	ESTUDIOS DE HINCHAMIENTO .....	98
3.	INCORPORACIÓN DEL FÁRMACO DOXORRUBICINA (DOX) EN LAS NANOPARTÍCULAS..	99
3.1	Determinación de la eficiencia de incorporación de la doxorubicina en las nanopartículas.....	99
4.	CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS .....	100

---

4.1	Caracterización del tamaño y la morfología .....	100
4.2	Análisis termogravimétrico (TGA).....	100
5.	LIBERACIÓN DEL FÁRMACO INCORPORADO EN LAS NANOPARTÍCULAS.....	101
6.	ESTUDIOS EN CULTIVOS CELULARES .....	102
6.1	Mantenimiento del cultivo celular.....	103
6.2	Subcultivo .....	104
6.3	Conservación del cultivo celular .....	104
6.4	Estudios de viabilidad celular .....	105
6.5	Incorporación celular de las partículas (UPTAKE).....	107
6.6	Evaluación de la incorporación celular de las partículas mediante receptores de folato ( <i>UPTAKE</i> ).....	108
6.7	Especies reactivas de oxígeno en células.....	109
6.8	Defensas antioxidantes en células.....	110
6.8.1	Cuantificación de la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD).....	110
6.8.2	Cuantificación de la actividad de la enzima catalasa (CAT).....	111
6.8.3	Cuantificación del glutatión total (GSSG/GSH).....	112
6.8.4	Cuantificación de la actividad de la enzima glutatión reductasa (GSSG- R).....	113
7.	ESTUDIOS DE BIOCOMPATIBILIDAD .....	114
7.1	Modelo animal y tratamiento con nanopartículas .....	114
7.2	Muestras sanguíneas .....	115
7.3	Estudios hematológicos .....	116
7.4	Estudios de coagulación.....	116
7.5	Estudios bioquímicos en plasma.....	116
7.5.1	Fosfatasa alcalina (ALP) .....	117
7.5.2	Alanina aminotransferasa (ALT) .....	117
7.5.3	Aspartato aminotransferasa (AST) .....	118
7.5.4	Creatinina .....	118
7.5.5	Nitrógeno ureico en sangre (BUN) .....	119

7.6 Defensas antioxidantes en órganos.....	119
7.7 Estudios histológicos.....	120
8. ESTUDIOS ESTADÍSTICOS.....	122
Resultados.....	123
1. SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS .....	125
1.1 Cuantificación del ácido fólico unido a las nanopartículas .....	125
2. HINCHAMIENTO DE LAS NANOPARTÍCULAS .....	126
3. INCORPORACIÓN DEL FÁRMACO A LAS NANOPARTÍCULAS .....	127
4. CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS .....	129
4.1 Microscopía electrónica de transmisión (TEM).....	129
4.2 Medidas de <i>Dynamic Light Scattering</i> (DLS) y potencial Z.....	132
4.3 Análisis termogravimétrico (TGA) .....	134
5. ESTUDIOS DE LIBERACIÓN DEL FÁRMACO .....	138
6. ESTUDIOS DE VIABILIDAD CELULAR .....	142
6.1 Curva dosis-respuesta .....	142
6.2 Viabilidad a diferentes tiempos .....	150
6.3 Estudios de incorporación de las nanopartículas.....	155
6.3.1 Bloqueo receptores de folato .....	162
6.4 Estudios estrés oxidativo en células.....	162
6.5 Estudios estrés oxidativo en células.....	164
7. ESTUDIOS DE BIOCOMPATIBILIDAD .....	166
7.1 Índice organosomático.....	166
7.2 Estudios hematológicos y de coagulación.....	168
7.2.1 Estudios hematológicos .....	168
7.2.2 Estudios de coagulación.....	171
7.3 Estudios bioquímicos en plasma .....	172
7.4 Estudios antioxidantes en órganos .....	174

---

7.5 Histologías .....	176
Discusión .....	181
Conclusiones .....	213
Bibliografía .....	217



# Índice de tablas

Tabla 1. Valores estimados de incidencia y mortalidad de diferentes tipos de cáncer en Europa durante el año 2020 .....	48
Tabla 2. Genes responsables de la resistencia múltiple a fármacos en humanos .....	58
Tabla 3. Protocolos actuales de administración de Doxorrubicina combinada con otros fármacos en función de la enfermedad a tratar. Dónde: (D) días de terapia; (Do) dosis; (Di) disolvente; (V) Volumen; (T) tiempo y (R) ruta de administración .....	60
Tabla 4. Relación entre la concentración de fármaco y las distintas composiciones de nanopartículas no funcionalizadas en función de la eficiencia de carga .....	106
Tabla 5. Relación entre la concentración de fármaco y las distintas composiciones de nanopartículas funcionalizadas en función de la eficiencia de carga .....	107
Tabla 6. Protocolo de tinción de las muestras histológicas. Cada una de las fases de inmersión con el tiempo en minutos .....	121
Tabla 7. Rendimiento obtenido en la síntesis de las nanopartículas mediante entrecruzamiento iónico .....	125
Tabla 8. Cantidad de NHS-folato unido a cada una de las distintas composiciones de nanopartículas .....	126
Tabla 9. Estudios de hinchamiento de las nanopartículas blanco en diferentes medios. *Diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) observadas para la misma composición de nanopartículas. + Diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) observadas entre PBS a pH 7,4 y PBS a pH 5 para la composición C80/A20 .....	127
Tabla 10. Cantidad de fármaco incorporado y eficiencia de incorporación de las nanopartículas sin funcionalizar. *Diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). Media $\pm$ SD ( $n=3$ ) .....	128
Tabla 11. Cantidad de fármaco incorporado y eficiencia de incorporación de las nanopartículas funcionalizadas. *Diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). Todos los datos se expresan como media $\pm$ SD ( $n=3$ ) .....	128
Tabla 12. Diámetros medios y polidispersidad obtenidos a partir de las fotografía de TEM de las nanopartículas .....	131
Tabla 13. Diámetros medios y polidispersidad obtenidos a partir de la técnica DLS .....	133
Tabla 14. Medida del potencial z de las nanopartículas .....	133
Tabla 15. Datos correspondientes al estudio de descomposición térmica de: los materiales de partida (BSA, quitosano y doxorrubicina), nanopartículas sin fármaco (C20/A80, C50/A50 and	

C80/A20) y nanopartículas con el fármaco incluido (C20/A80-DOX, C50/A50-DOX y C80/A20-DOX) .....	136
Tabla 16. Datos correspondientes al estudio de descomposición térmica de: nanopartículas funcionalizadas sin fármaco (C20/A80FI, C50/A50F y C80/A20F) y nanopartículas funcionalizadas con el fármaco incluido (C20/A80F-DOX, C50/A50F-DOX y C80/A20F-DOX)..	138
Tabla 17. Etapas de liberación de la Doxorubicina encapsulada en las nanopartículas no vehiculizadas: C20/A80-DOX; C50/A50-DOX y C80/A20-DOX. K representa el valor constante cinética de la liberación, que tenía un buen coeficiente de correlación ( $r^2$ ) .....	140
Tabla 18. Etapas de liberación de la Doxorubicina encapsulada en las nanopartículas vehiculizadas: C20/A80F-DOX; C50/A50F-DOX y C80/A20F-DOX. K representa el valor constante cinética de la liberación y $r^2$ el coeficiente de correlación.....	142
Tabla 19. Valores de $IC_{50}$ de cada tratamiento obtenido a partir de las gráficas de dosis-respuesta. El valor de $IC_{50}$ corresponde a la concentración equivalente de doxorubicina encapsulada. Los casos en los que no aparece dato no son calculables al no alcanzar la máxima toxicidad .....	149
Tabla 20. Disminución de la incorporación, expresada en porcentaje, de las nanopartículas funcionalizadas con fólido previo bloqueo de los receptores de folato de la superficie celular de las líneas celulares: MCF7, HeLa y T47D .....	162
Tabla 21. Marcadores bioquímicos en plasma. Medidas de AST en plasma sanguíneo de las ratas tratado con heparina a tres tiempos diferentes (0, 21 y 30 días) tras la administración de los nanosistemas. Todos los datos se presentan como media $\pm$ SD (n=4). Donde * diferencias significativas respecto al grupo control .....	172
Tabla 22. Marcadores bioquímicos en plasma. Medidas de ALT y ALP en plasma sanguíneo de las ratas tratado con heparina a tres tiempos diferentes (0, 21 y 30 días) tras la administración de los nanosistemas. Todos los datos se presentan como media $\pm$ SD (n=4). Donde * diferencias significativas respecto al grupo control.....	173
Tabla 23. Marcadores bioquímicos en plasma. Medidas de ALP en plasma sanguíneo de las ratas tratado con heparina a tres tiempos diferentes (0, 21 y 30 días) tras la administración de los nanosistemas. Todos los datos se presentan como media $\pm$ SD (n=4). Donde * d diferencias significativas respecto al grupo control. ....	173
Tabla 24. Medidas de CRE y BUN en plasma sanguíneo de las ratas tratado con heparina a tres tiempos diferentes (0, 21 y 30 días) tras la administración de los nanosistemas. Todos los datos se presentan como media $\pm$ SD (n=4). Donde * diferencias significativas respecto al grupo control .....	174

# Índice de figuras

Figura 1. Tasas estimadas ajustadas por edad (Mundo) de los casos de incidencia, en ambos sexos, de todos los cánceres excluyendo el de piel no melanoma en 2012. Imagen obtenida de <a href="http://www.who.int/es/">http://www.who.int/es/</a> .....	47
Figura 2: Estimación de nuevos casos de cáncer en 2020 en España. Datos extraídos de GLOBOCAN 2012 (IARC) .....	48
Figura 3: Representación esquemática de las diferentes formas de comunicación entre las células cancerígenas y las células endoteliales. Imagen modificada (Lopes-Bastos, Jiang, and Cai 2016) .....	51
Figura 4: Esquema representativo del efecto de permeabilidad y retención en el que el tejido patológico presenta mayor espacio entre las células endoteliales facilitando el paso de macromoléculas (Nehoff et al. 2014).....	52
Figura 5: Mecanismos de resistencia a fármacos (McIntosh, Balch, and Tiwari 2016) .....	57
Figura 6. Estructura química de la doxorubicina .....	61
Figura 7: Esquema comparativo de la concentración de fármaco de un sistema de liberación controlada (línea azul) frente a un sistema de administración convencional de cuatro dosis (línea discontinua).....	65
Figura 8. Representación esquemática de la estructura de un dendrímero .....	67
Figura 9. Representación esquemática de la estructura de un liposoma como sistema de liberación controlada de fármacos .....	68
Figura 10. Incorporación de nanopartículas al interior celular evadiendo los mecanismos de resistencia a fármacos de los transportadores ABC (Milane et al. 2011) .....	72
Figura 11. Estructura química del ácido fólico .....	78
Figura 12. Estructura química de la quitina y el quitosano .....	82
Figura 13. Estructura tridimensional de la estructura de la proteína albúmina sérica humana. La estructura cristalina de la proteína se obtuvo de Proteína Data Bank (ID code: 5ID7) .....	87



Figura 14. Esquema del procedimiento de síntesis de las nanopartículas .....	96
Figura 15. Recta de calibrado de la DOX. ....	102
Figura 16. Fundamento teórico de la medida de actividad enzimática de la superóxido dismutasa (SOD) .....	111
Figura 17. Fundamento teórico de la medida glutatión total .....	112
Figura 18. Fundamento teórico de la medida de la actividad de glutatión reductasa .....	113
Figura 19. Esquema del procesamiento de las muestras sanguíneas .....	115
Figura 20. Fundamento teórico de la determinación de fosfatasa alcalina.....	117
Figura 21. Fundamento teórico de la determinación de alanina aminotransferasa .....	118
Figura 22. Fundamento teórico de la determinación de aspartato aminotransferasa.....	118
Figura 23. Fundamento teórico de la determinación de BUN .....	119
Figura 24. Protocolo de inclusión en parafina .....	121
Figura 25. Imágenes obtenidas mediante microscopía de transmisión electrónica (TEM) de las nanopartículas: (A) nanopartículas C20/A80 (B) nanopartículas C20/A80-DOX (C) nanopartículas C20/A80F (D) nanopartículas C20/A80F-DOX. La barra oscura representa el tamaño de escala. ....	129
Figura 26. Imágenes obtenidas mediante microscopía de transmisión electrónica (TEM) de las nanopartículas: (A) nanopartículas C50/A50 (B) nanopartículas C50/A50-DOX (C) nanopartículas C50/A50F (D) nanopartículas C50/A50F-DOX. La barra oscura representa el tamaño .....	130
Figura 27. Imágenes obtenidas mediante microscopía de transmisión electrónica (TEM) de las nanopartículas: (A) nanopartículas C80/A20 (B) nanopartículas C80/A20-DOX (C) nanopartículas C80/A20F (D) nanopartículas C80/A20F-DOX. La barra oscura representa el tamaño .....	131
Figura 28. Primera derivada de TGA (DTG) de: monómeros de partida, doxorubicina, nanopartículas sintetizadas blanco y nanopartículas con fármaco incluido.....	135

Figura 29. Primera derivada de TGA (DTG) de: ácido fólico, nanopartículas blanco funcionalizadas y nanopartículas con fármaco incluido .....	137
Figura 30. Perfiles de liberación de la doxorubicina encapsulada en las nanopartículas no vehiculizadas: C20/A80-DOX; C50/A50-DOX y C80/A20-DOX .....	139
Figura 31. Perfiles de liberación de la doxorubicina encapsulada en las nanopartículas vehiculizadas C20/A80-DOX; C50/A50F-DOX y C80/A20F-DOX.....	141
Figura 32. Citotoxicidad en la línea celular MCF7 de las nanopartículas blanco y con fármaco a rango de concentración equivalente a 0,01 y 100 1 µg/mL de doxorubicina de las composiciones C20/A80, C50/A50 y C80/A20 .....	143
Figura 33. Citotoxicidad en la línea celular HeLa de las nanopartículas blanco y con fármaco a rango de concentración equivalente a 0,01 y 100 1 µg/mL de doxorubicina de las composiciones C20/A80, C50/A50 y C80/A20 .....	144
Figura 34. Citotoxicidad en la línea celular T47D de las nanopartículas blanco y con fármaco a rango de concentración equivalente a 0,01 y 100 1 µg/mL de doxorubicina de las composiciones C20/A80, C50/A50 y C80/A20 .....	145
Figura 35. Citotoxicidad en la línea celular MCF7 de las nanopartículas blanco funcionalizadas y funcionalizadas con fármaco incluido a rango de concentración equivalente a 0,01 y 100 1 µg/mL de doxorubicina de las composiciones C20/A80F, C50/A50F y C80/A20F.....	146
Figura 36. Citotoxicidad en la línea celular HeLa de las nanopartículas blanco funcionalizadas y funcionalizadas con fármaco incluido a rango de concentración equivalente a 0,01 y 100 1 µg/mL de doxorubicina de las composiciones C20/A80F, C50/A50F y C80/A20F.....	147
Figura 37. Citotoxicidad en la línea celular T47D de las nanopartículas blanco funcionalizadas y funcionalizadas con fármaco incluido a rango de concentración equivalente a 0,01 y 100 1 µg/mL de doxorubicina de las composiciones C20/A80F, C50/A50F y C80/A20F.....	148
Figura 38. Citotoxicidad de las nanopartículas blanco y con fármaco no funcionalizadas a una concentración equivalente a 1 µg/mL de Doxorubicina (la concentración de nanopartículas está en concordancia con los datos expresados en la tabla 4) .....	152
Figura 39. Citotoxicidad de las nanopartículas funcionalizadas y funcionalizadas con fármaco a una concentración equivalente a 1 µg/mL de doxorubicina (tabla 5) a diferentes tiempos. .	154

Figura 40. Incorporación de las nanopartículas (C20/A80, C50/A50 y C80/A20) en la línea celular MCF7 a una concentración equivalente a 1 µg/mL de doxorubicina, empleando cumarina como control. Las flechas rojas indican la posición de las nanopartículas .....	155
Figura 41. Incorporación de las nanopartículas (C20/A80, C50/A50 y C80/A20) en la línea celular HeLa a una concentración equivalente a 1 µg/mL de doxorubicina, empleando cumarina como control. Las flechas rojas indican la posición de las nanopartículas y los círculos los cristales de cumarina .....	156
Figura 42. Incorporación de las nanopartículas (C20/A80, C50/A50 y C80/A20) en la línea celular T47D a una concentración equivalente a 1 µg/mL de doxorubicina, empleando cumarina como control. Las flechas rojas indican la posición de las nanopartículas .....	157
Figura 43. Incorporación de las nanopartículas (C20/A80F, C50/A50F y C80/A20F) en la línea celular MCF7 a una concentración equivalente a 1 µg/mL de doxorubicina, empleando cumarina como control. Las flechas rojas indican la posición de las nanopartículas y los círculos los cristales de cumarina .....	158
Figura 44. Incorporación de las nanopartículas (C20/A80F, C50/A50F y C80/A20F) en la línea celular HeLa a una concentración equivalente a 1 µg/mL de doxorubicina, empleando cumarina como control. Las flechas rojas indican la posición de las nanopartículas y los círculos los cristales de cumarina .....	159
Figura 45. Incorporación de las nanopartículas (C20/A80F, C50/A50F y C80/A20F) en la línea celular T47D a una concentración equivalente a 1 µg/mL de doxorubicina, empleando cumarina como control .....	160
Figura 46. Cuantificación de la incorporación celular de las nanopartículas de composiciones C20/A80, C50/A50 y C80/A20 funcionalizadas y sin funcionalizar con ácido fólico. Los resultados se expresan como la media ± SD (n=5) Donde: * indica diferencias significativas entre las nanopartículas funcionalizadas y sin funcionalizar. ....	161
Figura 47. Formación de especies reactivas de oxígeno tras la inclusión de las nanopartículas durante una hora de incubación. Los resultados se expresan como la media ± SD (n=5) * Representa diferencias significativas respecto al grupo control y + diferencias significativas entre la misma composición funcionalizadas y sin funcionalizar .....	163
Figura 48. Defensas antioxidantes (catalasa, superóxido dismutasa, glutatión reductasa y glutatión total) en las líneas celulares MCF7, HeLa y T47D tras el tratamiento con las	

nanopartículas blanco no funcionalizadas. Todos los resultados se expresan como media $\pm$ SD (n=4). * Diferencias significativas respecto al grupo control .....	165
Figura 49. Defensas antioxidantes (catalasa, superóxido dismutasa, glutathione reductasa y glutathione total) en las líneas celulares MCF7, HeLa y T47D tras el tratamiento con las nanopartículas blanco funcionalizadas. Todos los resultados se expresan como media $\pm$ SD (n=4). * Diferencias significativas respecto al grupo control .....	166
Figura 50: Incremento de la masa de las ratas Wistar hembra durante los estudios de biocompatibilidad con los sistemas blanco. En todos los resultados media $\pm$ SD (n=4).....	167
Figura 51. Índice organosomático de las ratas Wistar hembra tras los estudios de biocompatibilidad con los sistemas blanco. En todos los resultados se expresan como la media $\pm$ SD (n=4) .....	167
Figura 52. Parámetros hematológicos de la línea roja medidos a tres tiempos diferentes (0, 9 y 30) después de la administración de las partículas. Todos los resultados se expresan como media $\pm$ SD (n=4). * Diferencias significativas con el grupo control .....	169
Figura 53. Parámetros hematológicos de la línea blanca medidos a tres tiempos diferentes (0, 9 y 30) después de la administración de las partículas. Todos los resultados se expresan como media $\pm$ SD (n=4). * Diferencias significativas con el grupo control .....	170
Figura 54. Parámetros hematológicos (plaquetas) medidos a tres tiempos diferentes (0, 9 y 30) después de la administración de las partículas. Todos los resultados se expresan como media $\pm$ SD (n=4). * Diferencias significativas con el grupo control .....	170
Figura 55. Factores de coagulación medidos a tres tiempos diferentes (1, 3 y 7) después de la administración de las nanopartículas. Todos los resultados se expresan como media $\pm$ SD (n=4). * Diferencias significativas con respecto al grupo control.....	171
Figura 56. Defensas antioxidantes (catalasa, superóxido dismutasa, glutathione reductasa y glutathione total) de los órganos hígado, riñón y bazo tras la extracción. Todos los resultados se expresan como media $\pm$ SD (n=4). * Diferencias significativas respecto al grupo control .....	175
Figura 57. Imágenes obtenidas por microscopía óptica (20x) de secciones de hígado bazo y riñón extraídas 30 días después de la inyección (20 mg/kg) y teñidas mediante el método Azul de Toluidina. Donde, v (vénula), s (sinusoide), p (parénquima), GR (glomérulo renal), t (tubule), pb (pulpa blanca), pr (pulpa roja) y T (trabécula conectiva) .....	177

Figura 58. Imágenes obtenidas por microscopía óptica (20x) de secciones de hígado bazo y riñón extraídas 30 días después de la inyección (20 mg/kg) y teñidas mediante el método Hematoxilina Eosina. Donde, v (vénula), s (sinusoide), p (parénquima), GR (glomérulo renal), t (túbulo), pb (pulpa blanca), pr (pulpa roja) y T (trabécula conectiva) .....	178
Figura 59. Imágenes obtenidas por microscopía óptica (20x) de secciones de hígado bazo y riñón extraídas 30 días después de la inyección (20 mg/kg) y teñidas mediante el método Tricómico. Donde, v (vénula), s (sinusoide), p (parénquima), GR (glomérulo renal), t (túbulo), pb (pulpa blanca), pr (pulpa roja) y T (trabécula conectiva) .....	179
Figura 60. Esquema del proceso de la activación del ácido fólico y su unión a los grupos amino de las nanopartículas .....	185
Figura 61. Esquema representativo de las interacciones entre la doxorubicina y las nanopartículas en la inclusión del fármaco.....	187
Figura 62.Estructura tridimensional de la estructura de la proteína albúmina sérica humana. En ella se aprecian los bolsillos hidrofóbicos de unión a anillos aromáticos. La estructura cristalina de la proteína se obtuvo de Proteína Data Bank (ID code: 2BXB) .....	187
Figura 63. Esquema de la relación entre algunas de las defensas antioxidantes .....	202



# ABSTRACT



## Abstract

Despite great advances have been achieved in cancer diagnosis and treatment, the disease still represents a significant burden with a major need of new and improved therapies. Currently, one of the main lines of treatment is chemotherapy, which has proved to be effective, but its application is limited due to the numerous adverse effects associated.

An example of these antineoplastic drugs is doxorubicin, which belongs to the anthracycline family. Doxorubicin is a broad spectrum drug used in many types of cancer. However, its use has important side effects, such as cardiotoxicity.

In the last years, the rise of nanotechnology and, more specifically, nanomedicine, has made possible the development of new nanometric systems of controlled release, capable of transporting drugs inside. These systems, increase the substance bioavailability and reduce the periods of toxicity and inefficiency typical of conventional treatments.

The adverse effects of antineoplastics could be minimized through encapsulation in controlled release nanosystems, while their efficacy could be improved. In addition, certain characteristics of solid tumors such as the "Enhanced Permeability Retention" effect (EPR), the acidic microenvironment of tumor cells and the overexpression of certain membrane-specific receptors provide distinctive features that can be specifically targeted by the delivery system, increasing the affected tissue and reducing harmful effects on healthy cells..

### Objective

For all these reasons, the main goal of this work is the synthesis of nanosystems based in natural polymers (chitosan and bovine serum albumin) to doxorubicin vehiculization in cancer therapy.

To achieve this goal, the following objectives were proposed:

- Synthesis and chemical-physical characterization of nanosystems based on the polysaccharide / protein combination, in particular chitosan / albumin.
- Vectorization of the systems with folate by the union of folic acid. Characterization of nanoparticulate systems vectored with the ligand.



- Encapsulation in the nanosystems of the antineoplastic, doxorubicin, to generate a nano-drug. Evaluation of nano-drugs as a controlled release system: quantification of the drug included and kinetic assessment.
- Evaluation of nanosystems in cell cultures of human breast cancer lines (MCF7 and T47D) and human cervix carcinoma epithelia, HeLa, in order to determine their internalization and effectiveness when they carry doxorubicin.
- *In vivo* biocompatibility analysis in rat model. The injection of the nanoparticles will allow to determine its effect on hematological parameters, biochemical markers of liver and renal damage, as well as antioxidant defenses in tissues.

## Methodology and results

Three compositions of different nanoparticles were synthesized modifying the proportion of chitosan (C) and albumin (A) by ionic cross-linking of the two compounds, using sodium tripolyphosphate (TPP) as a cross-linker.

After synthesis, nanoparticles were functionalized with folic acid. This process was performed in two steps: the activation of folic acid through the formation of an ester bond (NHS-folic) and later, the conjugation to the particles. The highest amount of folic acid bound to the nanoparticles was obtained for the composition C20 / A80 (176.0  $\mu\text{mol}$  folicle / g NP), and the lowest, for composition C80 / A20 (112.0  $\mu\text{mol}$  folicle / g NP).

Swelling studies were carried out in different media in order to choose the best solution for the incorporation of doxorubicin. For this purpose media were used in which the drug was soluble, such as ethanol, water and PBS (at two different pH values). It was observed that the medium in which less swelling occurred was in ethanol. Due to the good degree of swelling in water and, thanks to the advantages that this presented, it was decided to incorporate the drug in this medium.

Doxorubicin's characteristics were used to incorporate it in nanoparticles. It was obtained an encapsulation efficiency between 34 and 81%, corresponding to 5.2  $\mu\text{g}$  DOX/mg NP for composition C20/A80-DOX and 12.1  $\mu\text{g}$  DOX/mg NP for the composition C50/A50F-DOX,

respectively. In all cases, higher incorporation efficiency was obtained for the vectorized systems than for those without vectoring.

The size and morphology of the nanoparticles were studied by transmission electron microscopy (TEM). This technique defined a spherical morphology for all nanoparticle compositions, and size within a nanometer range (between 8.2 and 34.6 nm). In addition, the diameter of the nanoparticles was measured by Quasielastic Light Dispersion (DLS). Values obtained by DLS were higher than those found by microscopy (up to 40 times higher) but always within the nanometric range. Higher values may be due to the fact that the nanoparticles are swollen and to a possible aggregation between them, what data from potential z corroborated. In addition, the z-potential values defined a surface arrangement of doxorubicin, (more abundant in the composition with a lower proportion of chitosan).

Thermogravimetry studies (TGA) demonstrated the thermal stability of all compositions, since both vectorized and non-vectorized nanoparticles withstood temperatures above 190°C. Also, thermal degradation profiles were different from those of the initial monomers. In addition, one of the typical degradation stages of doxorubicin is not observed in the nanoparticles with the drug included, which seems to indicate that these systems are preventing degradation.

Drug release studies were carried out in PBS buffer at pH 7.4 and 37 ° C, in the dark. The drug was quantified by fluorescence. A rapid release of doxorubicin was found for all compositions in 10 minutes. The maximum release occurred between 22.5 and 47 hours in the case of non-functionalized nanoparticles (64 to 100% of the incorporated drug was released), and between 4 and 27.5 hours for the particles vectorized with folic acid (equivalent to a range of 58 and 77% of the drug encapsulated).

According to cellular uptake studies, all nanoparticle compositions were incorporated by all cell lines tested: MCF7, HeLa and T47D. In addition, quantitative measures showed a greater incorporation of nanoparticles carried with folic than non-vectorized nanoparticles. Moreover, studies of folate receptor blocking prior to the cellular uptake of the functionalized nanoparticles confirmed the internalization of nanosystems by these receptors.

With the aim of further explore the application of nanoparticles as a controlled delivery system for doxorubicin, several experiments were conducted on MCF7, HeLa and T47D tumor lines. Studies showed that nanoparticles are cytocompatible, and that this cytocompatibility decreases as a function of the amount of chitosan incorporated. In addition,

it was found that the drug did not lose its effectiveness once incorporated into the nanoparticles. These viability studies also showed a possible evasion of drug resistance mechanisms characteristic of tumor cells when treated with nanoparticles delivered with folic acid.

In order to know how the administration of the particles affected the oxidative stress of the cells, the reactive oxygen species (ROS) were measured and an increase was observed after the addition of nanosystems. Due to these results, mechanisms of antioxidant defense of the cell lines were studied after incorporation of the nanoparticles, in particular the catalase enzyme activity (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione reductase (GRRG-R), as well as total glutathione (GSSG / GSH). It was observed that different pathways of antioxidant defenses were activated depending on the nanoparticle compositions, and on the absence (non-vectorized particles) or presence of folic acid (vectorized particles). In any case, since no cell death occurred according to cytocompatibility studies, it appears that the antioxidant defenses are effective against the reactive oxygen species generated.

To confirm a good biocompatibility of the systems, subsequent studies were performed on *Wistar* rats. The non-functionalized compositions were administered by vein puncture of the tail. Both hematological and coagulation studies were performed to analyze hematocompatibility. Hematological studies showed a small alteration in hematocrit levels after 30 days of treatment for composition C80/A20, but within a normal range. Regarding the white cell line, an increase in leukocytes was observed 9 days after administration for compositions C20/A80 and C80/A20, which were again decrease by the end of treatment. Coagulation studies demonstrated modifications in fibrinogen, a protein that can interact with nanoparticles through ionic interactions, but no other parameter of coagulation was affected.

Due to the possible contact of the nanoparticles with organs, such as the liver, spleen and kidney, more exhaustive studies of these tissues were required. For this purpose, several biochemical markers were analyzed in plasma: alkaline phosphatase (ALP), alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) creatine (CRE) and blood urea nitrogen (BUN). The results indicated that there was no alteration of the tissues, since even the parameters affected were again normalized towards the end of the treatment. The measurements of antioxidant defenses in these organs demonstrated an activation of the different pathways leading to an effective defense against oxidative stress. Histological studies confirmed the absence of liver, kidney and spleen damage.

## Conclusions

- The ionic crosslinking method has allowed the synthesis of chitosan and albumin nanoparticles in different proportions. All compositions studied have a nanometric size, spherical morphology and smooth surface. Functionalization of the nanoparticles with folic acid was achieved for all systems.
- The inclusion of doxorubicin was carried out satisfactorily. Incorporation efficiencies depended on their polymer composition (34-71%). Folic acid-vectored particles encapsulate the drug with a higher efficiency than non-vectored (46-81%). Part of the drug remains in the most superficial zone of the nanoparticles, in both systems.
- Release of doxorubicin from nanoparticles in vitro presents a *burst* effect in the first 10 minutes. The maximum release is between 22.5 and 47 hours in the function of the polymer composition for the non-vectored nanosystems. Folic acid binding causes a decrease in the time of maximum release (4 and 27.5 hours). Release occurs in two stages, a faster stage and another. Interactions between doxorubicin and components of nanoparticles are important in the slower state.
- Studies of incorporation of the nanoparticles have demonstrated internalization into the cellular interior. The functionalization of the systems has increased cellular uptake by interaction of folic acid with cell surface folate receptors.
- All nanosystems are cytocompatible. The cellular viability is dependent on the composition of the nanoparticle, decreasing when the proportion of chitosan increases. The presence of doxorubicin in nanoparticles decreases cell viability, which is indicative that the drug is still effective. In addition, it is clear that these systems can overcome drug resistance, especially when they are functionalized.
- Intravenous administration of nanoparticles without drug and without folic acid in *Wistar* rats, does not produce remarkable alterations neither at hematological nor hepatic and renal level. The presence in the organism of the nanoparticles generates free radicals as reflected in the modifications of the observed antioxidant defenses. We can consider that there are no negative consequences after the administration of the systems to experimental animals.



An abstract graphic on the right side of the page, consisting of a vertical grey bar with a pattern of interconnected circles and lines in shades of red, green, and grey, resembling a molecular or network structure.

# RESUMEN



## Resumen

A pesar de los numerosos avances que se ha conseguido en el diagnóstico del cáncer, así como en el tratamiento de la patología, todavía son muchas las mejoras que se tratan de conseguir para poder ponerle freno al avance de la enfermedad. Actualmente, una de las principales líneas de tratamiento es la quimioterapia, la cual ha demostrado su eficacia, pero su uso está limitado debido a los numerosos efectos adversos que derivan de él.

Un ejemplo de estos fármacos antineoplásicos es la doxorrubicina, perteneciente a la familia de las antraciclinas, es un fármaco de amplio espectro empleado en numerosos tipos de cáncer. Sin embargo, presenta importantes efectos secundarios derivados de su uso tales como la cardiotoxicidad.

Por otro lado, el auge de la nanotecnología y, más concretamente, de la nanomedicina, ha hecho posible el desarrollo de nuevos sistemas nanométricos de liberación controlada, capaces de transportar fármacos en su interior, aumentando su biodisponibilidad y disminuyendo los periodos de toxicidad e ineficacia propios de los tratamientos convencionales.

La eficacia de la quimioterapia, unida a los efectos adversos de la misma, han hecho que los antineoplásicos sean buenos candidatos para ser encapsulados en el interior de nanosistemas de liberación controlada. Además, ciertas características propias de los tumores sólidos tales como el efecto de “Permeabilidad y Retención Aumentadas” (EPR), el microambiente ácido de las células tumorales o la sobreexpresión de ciertos receptores específicos de membrana, han hecho que estos sistemas puedan dirigirse de manera específica al tumor, aumentando su permanencia en el mismo y afectando en menor medida a las células sanas.

## Objetivos

Por todo lo expuesto anteriormente, el objetivo principal del presente trabajo se basa en la síntesis de nanosistemas basados en polímeros naturales (quitosano y albúmina) la vehiculización del fármaco antineoplásico doxorrubicina en la terapia del cáncer.

Para conseguirlo, se establecieron varios objetivos secundarios tales como:



- Síntesis y caracterización químico-física de nanosistemas basados en la combinación polisacárido/proteína, concretamente quitosano/albumina.
- Vectorización con folato de los sistemas obtenidos mediante la unión de ácido fólico. Caracterización de los sistemas nanoparticulados vectorizados con el ligando.
- Encapsulación en los nanosistemas del antineoplásico, doxorubicina, para generar un nanofármaco. Evaluación de los nanofármacos como sistema de liberación controlada: cuantificación del fármaco incluido y valoración de la cinética de liberación.
- Evaluación de los nanosistemas en cultivos celulares de líneas de cáncer de mama humano, MCF7 y T47D y de carcinoma de cérvix humano, HeLa, con el fin de determinar su internalización y su efectividad cuando vehiculizan la doxorubicina.
- Análisis de la biocompatibilidad *in vivo* en modelo de rata. La inyección de las nanopartículas permitirá determinar su efecto en parámetros hematológicos, marcadores bioquímicos plasmáticos de daño hepático y renal, así como defensas antioxidantes en tejidos.

## Metodología y resultados

Se sintetizaron tres composiciones de nanopartículas diferentes variando la composición de quitosano (C) y albumina (A) mediante entrecruzamiento iónico de ambos compuestos, empleando el tripolifosfato sódico (TPP) como entrecruzante.

Tras la síntesis se realizó la unión del ácido fólico, la cual se realizó en dos etapas: la activación del ácido fólico mediante la formación de un enlace éster (NHS-fólico) y su conjugación a las partículas. La mayor cantidad de ácido fólico unido a las nanopartículas se obtuvo en el caso de la composición C20/A80, uniéndose 176,0  $\mu\text{mol}$  fólico/g NP, y la menor para la composición C80/A20, 112,0  $\mu\text{mol}$  fólico/g NP.

Una vez sintetizadas las partículas tanto vectorizadas con ácido fólico como sin vectorizar, se procedió a los estudios de hinchamiento en distintos medios con el fin de escoger el mejor medio para la incorporación de la doxorubicina. Para ello se emplearon medios en los que el fármaco era soluble, tales como el etanol, el agua y el PBS (a dos valores de pH distintos) y se observó que el medio en el que se producía un menor hinchamiento era en el etanol. Debido al buen grado de hinchamiento en agua y, gracias a las ventajas que este presentaba, se decidió incorporar el fármaco en este medio.

Para incorporar el fármaco se emplearon las características del mismo, así como las de las nanopartículas, obteniéndose una eficiencia de encapsulación entre un 34 y un 81 %, correspondientes a 5,2 µg DOX/mg NP para la composición C20/A80-DOX y 12,1 µg DOX/mg NP para la composición C50/A50F-DOX, respectivamente. En todos los casos se obtuvo una mayor eficiencia de incorporación para los sistemas vectorizados que sin vectorizar.

El tamaño y la morfología de las nanopartículas se estudiaron mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM). Esta técnica permitió definir una morfología esférica para todas las composiciones de las nanopartículas, así como un rango nanométrico entre 8,2 y 34,6 nm. Además, se evaluó el diámetro de las nanopartículas por Dispersión de Luz Quasielástica (DLS), con lo que se obtuvieron valores de tamaños superiores a los obtenidos mediante la microscopía (hasta 40 veces superiores) pero siempre dentro del rango nanométrico, lo que puede deberse tanto a que las nanopartículas se encuentran hinchadas como a una posible agregación entre ellas, lo que se corrobora con los datos obtenidos de potencial Z. Además, los valores de potencial z, permitieron definir una disposición superficial de la doxorubicina, principalmente en la composición con menor proporción de quitosano.

Los análisis de termogravimetría (TGA), demostraron la estabilidad térmica de todas las composiciones (temperaturas superiores a 190 °C), tanto con ácido fólico unido como sin vectorizar. Así como perfiles de degradación térmica diferentes a los de los monómeros de partida. Además, una de las etapas de degradación características de la doxorubicina no se observa en las nanopartículas con el fármaco incluido, lo que parece indicar una protección del mismo ante la degradación.

Los estudios de liberación del fármaco se llevaron a cabo en tampón PBS a pH 7,4 a 37 °C en oscuridad. El fármaco se cuantificó por fluorescencia. Todos ellos mostraron una rápida liberación de la doxorubicina para todas las composiciones de una duración de 10 minutos. El máximo de liberación tuvo lugar entre las 22,5-47 horas en el caso de las nanopartículas no funcionalizadas en las que se liberó un 64 y un 100% del fármaco incorporado, y entre 4-27,5 horas para las partículas vehiculizadas en las que se liberó entre el 58 y 77% del fármaco.

Los estudios de incorporación celular demostraron que para todas las composiciones de nanopartículas, funcionalizadas y sin funcionalizar con ácido fólico, y para todas las líneas celulares (MCF7, HeLa y T47D) se producía la internalización de las nanopartículas. Además, se observó mediante medidas cuantitativas una mayor incorporación en el caso de las

nanopartículas vehiculizadas con fólico. Adicionalmente, los estudios de bloqueo de receptores de folato previos a la incorporación celular de las nanopartículas funcionalizadas, confirmaron la internalización de las mismas debido a estos receptores, ya que la incorporación disminuye al tratar previamente las células con ácido fólico.

Para confirmar el posible empleo de las nanopartículas como sistemas de liberación controlada en la liberación de la doxorubicina, se estudió su efecto en las líneas tumorales MCF7, HeLa y T47D. Los estudios demostraron que las nanopartículas son citocompatibles, y que esta citocompatibilidad disminuye en función de la cantidad de quitosano incorporado. Además, se demostró que el fármaco no perdía su eficacia al ser incorporado en las nanopartículas. Estos estudios de viabilidad mostraron, también, una posible evasión de los mecanismos de resistencia a fármacos propios de las células tumorales cuando se trataban con las nanopartículas vehiculizadas con ácido fólico.

Para saber cómo afectaba la administración de las partículas al estrés oxidativo de los cultivos celulares, se midieron las especies reactivas de oxígeno (ROS) observándose un aumento de las mismas tras ser administrados los nanosistemas. En consonancia con estos resultados, se estudiaron distintos mecanismos de defensa antioxidante de las líneas celulares tras la incorporación de las nanopartículas, para ello se midió la actividad enzimática de catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD) y glutatión reductasa (GRRG-R) así como el glutatión total (GSSG/GSH). En los resultados se observó que las distintas composiciones de nanopartículas activaban diferentes vías de defensas antioxidantes, al igual que se veían diferencias entre las nanopartículas vectorizadas con ácido fólico y sin vectorizar. En cualquier caso, y dado que no se produce muerte celular de acuerdo con los estudios de citocompatibilidad, parece que las defensas antioxidantes son efectivas frente a las especies reactivas de oxígeno generadas.

Para asegurar una buena biocompatibilidad de los sistemas, se realizaron estudios en ratas *Wistar*. Para ello se administraron las composiciones blanco no funcionalizadas mediante punción en vena de la cola. Para analizar la hematocompatibilidad se realizaron tanto estudios hematológicos como de coagulación. Los estudios hematológicos mostraron una pequeña alteración de los niveles de hematocrito tras 30 días de tratamiento para la composición C80/A20, pero encontrándose dentro de los rangos normales. Respecto a la línea celular blanca se observó un aumento de los leucocitos 9 días después de la administración, para las composiciones C20/A80 y C80/A20, que se recuperaron al finalizar el tratamiento. Los estudios

de coagulación demostraron modificaciones únicamente en el fibrinógeno, proteína que puede interactuar con las nanopartículas mediante interacciones iónicas, pero sin verse afectado ningún otro parámetro de la coagulación.

Debido al posible contacto de las nanopartículas con órganos como el hígado, el bazo y el riñón, fue necesario realizar estudios más exhaustivos de dichos tejidos. Para ello se estudiaron marcadores bioquímicos en plasma propios de estos órganos como son la fosfatasa alcalina (ALP), la alanina aminotransferasa (ALT) y la aspartato aminotransferasa (AST) y la creatinina (CRE) y el nitrógeno ureico en sangre (BUN). Todos los resultados obtenidos indican que no existe alteración de los tejidos, ya que en el caso de producirse un incremento en los resultados se volvió a la normalidad al finalizar el tratamiento. Las medidas de defensas antioxidantes de estos órganos demostraron una activación de las distintas vías produciéndose una defensa eficaz en estos órganos frente al estrés oxidativo. Los estudios histológicos terminaron por confirmar la ausencia de daño en hígado, riñón y bazo.

## Conclusiones

- El método de entrecruzamiento iónico ha permitido la síntesis de las nanopartículas de quitosano y albúmina en diferentes proporciones. Todas las composiciones estudiadas tienen un tamaño nanométrico, morfología esférica y superficie lisa. La funcionalización de las nanopartículas con ácido fólico se consiguió para todos los sistemas; la caracterización de los mismos demostró un ligero aumento del tamaño, aunque se mantiene el rango nanométrico, la superficie lisa y la morfología esférica.
- La inclusión de doxorrubicina se llevó a cabo de manera satisfactoria, si bien la eficiencia de incorporación depende de la composición polimérica (34-71%). Las partículas vectorizadas con ácido fólico encapsulan el fármaco con una eficiencia superior a las no vectorizadas (46-81%). Parte del fármaco queda en la zona más superficial de las nanopartículas, en ambos sistemas.
- La liberación de doxorrubicina desde las nanopartículas *in vitro*, simulando ambientes fisiológicos, para las distintas composiciones de nanopartículas, estén o no vectorizadas, presentan un efecto *burst* en los primeros minutos (10 minutos). La liberación máxima está comprendido entre las 22,5 y 47 horas en función de la composición polimérica para los nanosistemas no vectorizados. La unión del ácido fólico provoca una disminución en el tiempo de máxima liberación (4 y 27,5 horas). En ambos casos, la liberación se produce en dos etapas, una etapa más rápida y otra más

lenta, en esta última, son importantes las interacciones entre la doxorubicina y los componentes de las nanopartículas, lo que justifica que en algunos casos no se produzca la liberación total del fármaco.

- Los estudios de incorporación de las nanopartículas al interior celular, han demostrado una internalización de todas las nanopartículas independientemente de la línea celular. La funcionalización de los sistemas ha incrementado de los mismos por su interacción con los receptores de folato de la superficie celular, lo que se hace evidente al bloquearlos.
- Todos los nanosistemas son citocompatibles. La viabilidad celular es dependiente de la composición de la nanopartícula, disminuyendo cuando aumenta la proporción de quitosano. La presencia de doxorubicina en las nanopartículas, disminuye la viabilidad celular, lo que es indicativo de que el fármaco sigue siendo eficaz. Además, queda patente que gracias a estos sistemas puede vencerse la resistencia a fármacos, sobre todo cuando están funcionalizados.
- La administración intravenosa de las nanopartículas sin fármaco y sin vectorizar en ratas *Wistar*, no produce alteraciones reseñables ni a nivel hematológico ni hepático y renal. La presencia en el organismo de las nanopartículas, genera radicales libres como queda reflejado en las modificaciones de las defensas antioxidantes observadas. Podemos considerar que no existen consecuencias negativas tras la administración de los sistemas a los animales de experimentación.

A decorative pattern of interconnected circles and lines, resembling a molecular or network structure, is positioned on the right side of the page. The circles are in shades of red, green, and grey, and the lines are thin and grey.

# ABREVIATURAS



# Abreviaturas

<b>A</b>	albúmina
<b>ABC</b>	proteína de unión a ATP
<b>ALP</b>	fosfatasa alcalina
<b>ALT</b>	alanina aminotransferasa
<b>ANOVA</b>	análisis de la varianza
<b>AST</b>	aspartato aminotransferasa
<b>BSA</b>	albúmina bovina sérica
<b>BUN</b>	nitrógeno ureico en sangre
<b>C</b>	quitosano
<b>C20/A80</b>	nanopartículas basadas en 20% de quitosano y 80% de albúmina
<b>C20/A80F</b>	nanopartículas basadas en 20% de quitosano y 80% de albúmina funcionalizadas con ácido fólico
<b>C50/A50</b>	nanopartículas basadas en 50% de quitosano y 50% de albúmina
<b>C50/A50F</b>	nanopartículas basadas en 50% de quitosano y 50% de albúmina funcionalizadas con ácido fólico
<b>C80/A20</b>	nanopartículas basadas en 80% de quitosano y 20% de albúmina
<b>C80/A20F</b>	nanopartículas basadas en 80% de quitosano y 20% de albúmina funcionalizadas con ácido fólico
<b>C20/A80-DOX</b>	nanopartículas basadas en 20% de quitosano y 80% de albúmina con doxorubicina incorporada
<b>C20/A80F-DOX</b>	nanopartículas basadas en 20% de quitosano y 80% de albúmina funcionalizadas con ácido fólico con doxorubicina incorporada
<b>C50/A50-DOX</b>	nanopartículas basadas en 50% de quitosano y 50% de albúmina con doxorubicina incorporada
<b>C50/A50F-DOX</b>	nanopartículas basadas en 50% de quitosano y 50% de albúmina funcionalizadas con ácido fólico con doxorubicina incorporada
<b>C80/A20-DOX</b>	nanopartículas basadas en 80% de quitosano y 20% de albúmina con doxorubicina incorporada
<b>C80/A20F-DOX</b>	nanopartículas basadas en 80% de quitosano y 20% de albúmina funcionalizadas con ácido fólico con doxorubicina incorporada
<b>CAT</b>	catalasa



<b>CCR</b>	cáncer colorrectal
<b>CRE</b>	creatinina
<b>DLS</b>	dispersión cuasielástica de luz (Dynamic Light Scattering)
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
<b>DMSO</b>	dimetil sulfóxido eter
<b>DOX</b>	doxorrubicina
<b>EDTA</b>	ácido etilendiaminotetraacético
<b>EPR</b>	permeabilidad y retención aumentadas
<b>ER</b>	receptor de estrógeno
<b>F</b>	ácido fólico
<b>FBS</b>	suero fetal bovino
<b>FR</b>	receptor de ácido fólico
<b>Fbg</b>	fibrinógeno
<b>GRRG-R</b>	glutation reductasa
<b>GSSG/GSH</b>	glutation total
<b>HeLA</b>	Línea celular de carcinoma de cérvix humano
<b>HER</b>	receptor del factor de crecimiento epidérmico humano
<b>i.v.</b>	intravenoso
<b>MCF7</b>	línea celular de carcinoma de mama humano
<b>MCH</b>	hemoglobina corpuscular media
<b>MCHC</b>	concentración promedio de hemoglobina corpuscular
<b>MTT</b>	metiltiazol tetrazolio
<b>NHS</b>	N-hidroxisuccinimida
<b>NP</b>	nanopartícula
<b>PBS</b>	tampón fosfato salino
<b>PR</b>	receptor de progesterona
<b>RBC</b>	células rojas de la sangre
<b>ROS</b>	especies reactivas de oxígeno
<b>SOD</b>	superóxido dismutasa
<b>T47D</b>	línea celular de carcinoma de mama humano
<b>TEA</b>	trietilamina
<b>TEM</b>	microscopía de transmisión electrónica
<b>TGA</b>	análisis termogravimétrico
<b>TP</b>	tiempo de protrombina

An abstract graphic on the right side of the page, consisting of a vertical grey bar with a pattern of interconnected circles and lines in shades of red, green, and grey, resembling a molecular or network structure.

# INTRODUCCIÓN



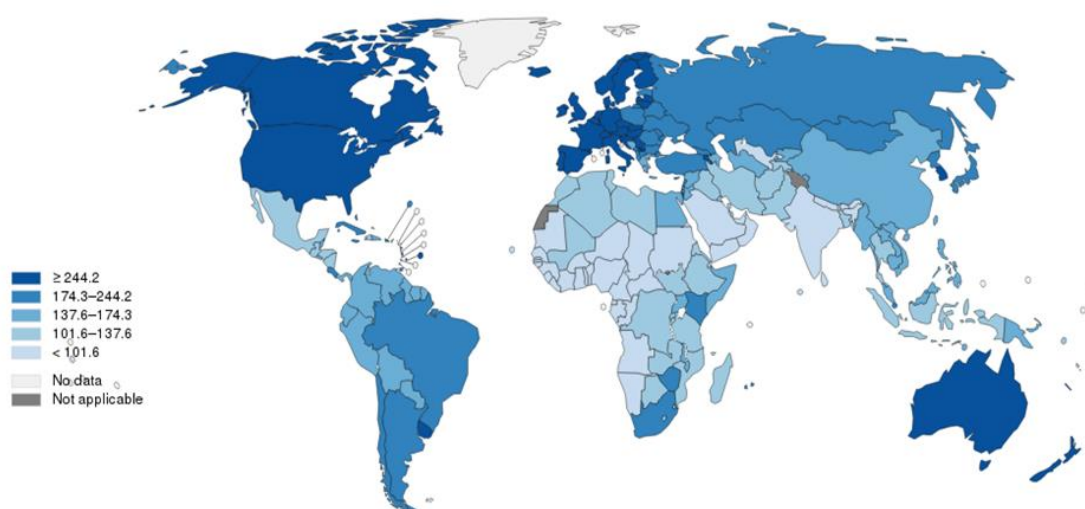
# Introducción

## 1. CÁNCER

### 1.1 El cáncer y su incidencia

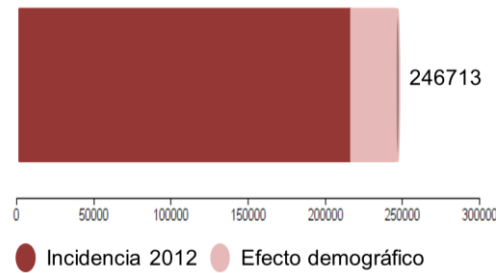
Una de las principales causas de mortalidad actuales en todo el mundo es el cáncer. Bajo este nombre se recogen diversas enfermedades que tienen en común la rápida y anormal multiplicación de las células producida en cualquier parte del organismo y que puede llegar a afectar a tejidos adyacentes. Existen diversos factores conocidos que pueden provocar su aparición o favorecer su avance, tales como la exposición a la luz ultravioleta o el consumo de tabaco, pero también existen otros factores, como mutaciones genéticas sin relación con algún factor externo.

El cáncer es una enfermedad que no conoce de barreras y afecta a gran parte de la población mundial sin ningún tipo de discriminación por edad, género o etnia. Actualmente, una de cada siete muertes en el mundo se debe a esta enfermedad, superando de esta manera al SIDA, tuberculosis y malaria como causa de muerte. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, en 2012 se diagnosticaron más de 14 nuevos millones de casos de cáncer en todo el mundo y se produjeron más de 8 millones de muertes por la enfermedad (figura 1).



**Figura 1. Tasas estimadas ajustadas por edad (Mundo) de los casos de incidencia, en ambos sexos, de todos los cánceres excluyendo el de piel no melanoma en 2012. Imagen obtenida de <http://www.who.int/es/>**

Esta morbilidad parece ir en aumento, ya que se estima que en 2020 el número de nuevos casos diagnosticados en España sea de 246.713, frente a los 215.534 que fueron diagnosticados en 2012; este preocupante incremento de la tasa de incidencia es la causante de que sea una prioridad, tanto por motivos humanos como económicos (figura 2).



**Figura 2: Estimación de nuevos casos de cáncer en 2020 en España. Datos extraídos de GLOBOCAN 2012 (IARC)**

A partir de los datos obtenidos en GLOBOCAN, se pudo hacer una estimación de los casos de incidencia y mortalidad de los distintos tipos de cáncer en Europa en el año 2020 (tabla 1).

**Tabla 1. Valores estimados de incidencia y mortalidad de diferentes tipos de cáncer en Europa durante el año 2020**

CÁNCER	INCIDENCIA	MORTALIDAD
TODOS	3.734.976	1.932.521
VEJIGA	168.601	58.419
CEREBRO (SN)	60.624	48.459
MAMA	487.517	141.053
CERVIX	59.115	25.592
COLORRECTAL	494.053	237.387
CORPUS UTERO	107.145	25.917
VESÍCULA BILIAR	32.787	22.998
LINFOMA DE HODKIN	17.456	4.837
SARCOMA DE KAPOSÍ	2.231	320
RIÑÓN	125.805	54.082
LARINGE	43.657	21.802
LEUCEMIA	89.291	58.948
HÍGADO	70.290	68.873
PULMÓN	454.469	393.048
MELANOMA DE PIEL	106.359	24.017
NASOFARÍNGEO	4.387	2.287
LINFOMA NO HODKING	101.333	41.596
ÓSEO	50.618	43.704
OVARIO	69.663	46.217

CÁNCER	INCIDENCIA	MORTALIDAD
PÁNCREAS	128.787	130.739
PRÓSTATA	455.732	104.282
ESTÓMAGO	153.642	118.110
TESTÍCULOS	20.555	1.623
TIROIDES	54.490	6.925

## 1.2 Características fisiológicas de los tumores sólidos

A pesar de la heterogeneidad de la enfermedad, existen diversos eventos comunes a todos los tumores. Durante años se ha llevado a cabo una búsqueda exhaustiva de las posibles rutas moleculares responsables de la enfermedad, dando como resultado la identificación y caracterización de numerosos genes que se encuentran mutados. Para comprender la relevancia de estas mutaciones y cómo pueden afectar al crecimiento tumoral, se establecieron diversos eventos, conocidos como marcadores o *hallmarks*, que marcan el proceso por el que una célula sana llega a convertirse en una célula tumoral. Esta evolución comienza con una única célula comportándose de manera anormal dividiéndose de forma descontrolada y, en ciertas ocasiones, desplazándose de su lugar de origen a otros tejidos (Beerenwinkel et al. 2015; Horne et al. 2015; Stickles et al. 2015). Estos *hallmarks* se pueden resumir en cinco puntos:

- Estimulación del crecimiento
- Evasión de los supresores de crecimiento
- Resistencia a la apoptosis
- Inducción de la angiogénesis
- Activación de la invasión y metástasis

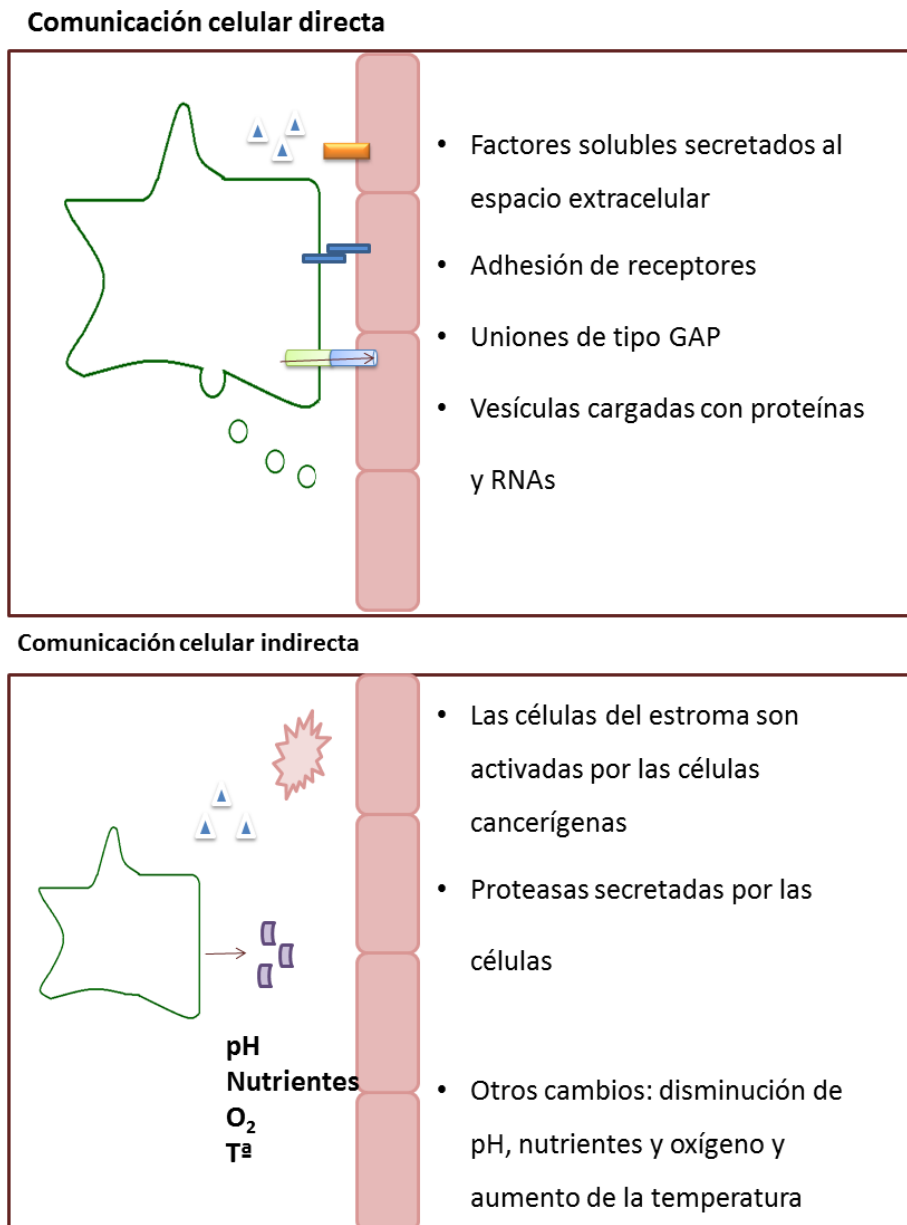
Recientemente se han añadido a estos eventos la existencia de rutas metabólicas anormales y una evasión del sistema inmune. Es decir, se piensa que las células cancerígenas surgen como resultado de una acumulación de defectos de la maquinaria de control de la división celular. Cuando estos acontecimientos ocurren, las células pierden la capacidad de regular su crecimiento y comienza a producirse una proliferación descontrolada en la que las células se dividen permanentemente.

Los tumores no están compuestos únicamente por células tumorales que se replican permanentemente, sino también por otros tipos celulares, denominados células del estroma, que conforman en su conjunto el microambiente tumoral y con las que son capaces de comunicarse, al igual que existe comunicación entre células en los tejidos sanos. La división descontrolada de las células tumorales hace que el metabolismo celular aumente y la célula requiera más energía de lo normal y, por ello, más nutrientes. Este requerimiento energético conlleva que el tumor no pueda crecer más de 2 ó 3 mm de diámetro, ya que la vasculatura existente no es capaz de satisfacerlo. La supervivencia del tumor depende, por tanto, de la capacidad que tenga para desarrollar nuevos vasos sanguíneos por los que obtener nutrientes (Lopes-Bastos et al. 2016).

Esto hace que el microambiente de las células sea un factor crítico en el desarrollo y mantenimiento del tumor. Este microambiente está formado por un complejo entramado que incluye células multipotentes, células madre mesenquimales, fibroblastos, vasos sanguíneos, precursores de células endoteliales, células del sistema inmune y factores de crecimiento secretados como son las citoquinas. Los cambios en el microambiente se van sucediendo según va progresando el tumor, haciendo que los cambios que se han producido en las células cancerígenas se vayan transmitiendo a su alrededor. La mayor parte de los “hallmarks” del cáncer que se han mencionado con anterioridad están relacionados con este microambiente, como son la inhibición de la apoptosis y del reconocimiento del sistema inmune (Wijeratne et al. 2016; Casey et al. 2015).

Fue Judah Folkman quien, en 1971, planteó la hipótesis de que el crecimiento del tumor depende de la angiogénesis. La angiogénesis es el proceso fisiológico por el cual nuevos vasos sanguíneos se forman a partir de otros preexistentes (Yujie Zhao & Adjei 2015). De acuerdo con esta hipótesis, las células endoteliales pueden cambiar de un estado de reposo a un estado de crecimiento al llegarles una señal química procedente de las células tumorales. Este cambio puede deberse o bien al aumento de la producción de una o varias sustancias activadoras de la angiogénesis o a la disminución de la producción de sustancias inhibidoras de la angiogénesis. Como activadores de la angiogénesis nos podemos encontrar, entre otros, el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), el factor 2 de crecimiento de fibroblastos (FGF-2), la interleucina 8 (IL-8), el factor de crecimiento placentario (PIGF), el factor de crecimiento beta derivado de plaquetas (TGF $\beta$ ) o angiopoyetinas. Como sustancias inhibidoras de la angiogénesis podemos encontrar la endostatina, angiostatina o la trombospondina. En definitiva, esta angiogénesis derivada del crecimiento tumoral se debe a una desregulación

entre las señales de activación y de inhibición de este proceso, que también se da en tejidos sanos, principalmente en el estado embrionario pero también en adultos en procesos de reparación o en el ciclo del ovario (Z. Wang et al. 2015). En la figura 3 se representan algunas de estas interacciones entre células.

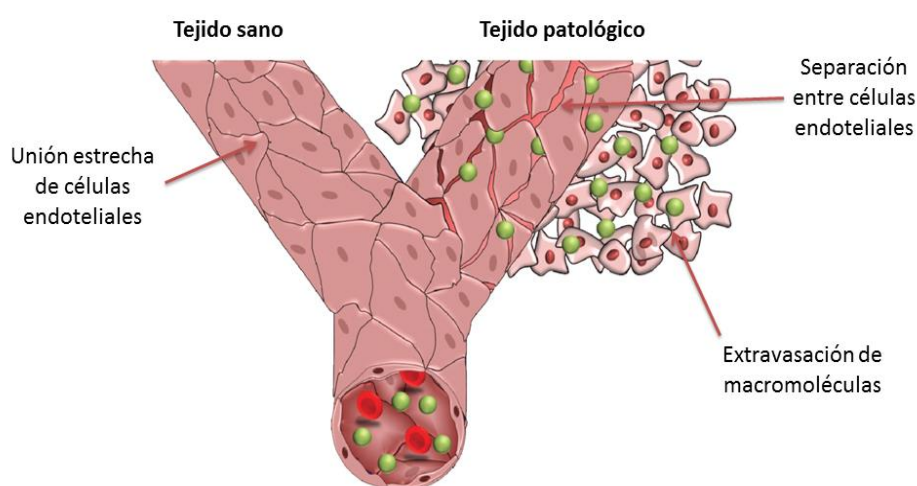


**Figura 3. Representación esquemática de las diferentes formas de comunicación entre las células cancerígenas y las células endoteliales. Imagen modificada (Lopes-Bastos et al. 2016)**

La desregulación entre los factores proangiogénicos y los antiangiogénicos tiene como resultado la formación de una capa endotelial discontinua en los nuevos vasos



sanguíneos formados, donde las defenestraciones entre las células endoteliales pueden llegar a tener un tamaño de entre 300 nm y 4700 nm. Además de la formación de una vasculatura porosa, la producción de un sistema linfático que permita la eliminación de las sustancias de desecho no se produce de forma coordinada y el sistema linfático existente se ve comprimido por el crecimiento del tumor. Como resultado de este drenaje linfático insuficiente, los productos del metabolismo celular de las células tumorales se almacenan más que lo harían en células normales (Nehoff et al. 2014). A este fenómeno se le conoce como “Efecto de Permeabilidad y Retención Aumentadas” (EPR) (figura 4) (Kalomiraki et al. 2015).



**Figura 4. Esquema representativo del efecto de permeabilidad y retención en el que el tejido patológico presenta mayor espacio entre las células endoteliales facilitando el paso de macromoléculas (Nehoff et al. 2014)**

Los requerimientos energéticos de las células tumorales y la elevada síntesis de nucleótidos llevan al llamado “efecto Warburg”, el cual se produce por la obtención de ATP a través de una ruptura no oxidativa de la glucosa y que conlleva un aumento del lactato extracelular y de protones como consecuencia de este metabolismo. Los protones y el lactato extracelular, debido a la débil vasculatura formada en torno al tumor, no son eliminados y se concentran en el espacio extracelular, dotando al entorno del tumor de características ácidas. Al contrario de lo que ocurre con las células normales, las células tumorales sí son capaces de crecer en un entorno ácido (Goodwin et al. 2014).

Además de estas características comunes a todos los tumores sólidos, existen ciertas diferencias moleculares de unos tumores a otros que se pueden emplear tanto para su

diagnóstico como para un tratamiento más eficaz. A continuación se exponen algunos casos representativos.

### **1.2.1 Cáncer de mama**

Sin tener en cuenta el cáncer de piel, uno de cada tres casos de cáncer se trata de cáncer de mama, llegando a ser la segunda causa de muerte por cáncer en mujeres, sobrepasado únicamente por el cáncer de pulmón (Desantis et al. 2016). El cáncer de mama varía su pronóstico en función de sus características y del momento de su diagnóstico, encontrándose una peor prognosis en cánceres diagnosticados a una edad temprana inferior a los 50 años. Tiene su origen principalmente en mutaciones de los genes BRCA1 y BRCA2, siendo a su vez la mayor parte de los cánceres de mama hereditarios (Bayraktar et al. 2014). Tanto a la hora de dividir a pacientes en un ensayo clínico, como a la de elegir el tratamiento más efectivo para cada paciente, se han empleado parámetros clínicos y marcadores patológicos como son el receptor de estrógeno (ER), el receptor de progesterona (PR) y el factor de crecimiento epidérmico 2 (HER2) (Prat et al. 2015).

El factor de crecimiento epidérmico HER2 está sobreexpresado en el 15-30 % de los casos de cáncer de mama invasivos, por lo que esta estructura, y más concretamente su dominio extracelular, se ha empleado como diana en el tratamiento con anticuerpos monoclonales con el fin de inhibir la proliferación celular, como es el caso del Trastuzumab (Kataoka et al. 2016).

El receptor de estrógeno (ER) se expresa aproximadamente en el 80 % de los casos. Los cánceres de mama ER+ se suelen tratar empleando como dianas el receptor de estrógenos (fármacos moduladores del receptor de estrógenos, SERMs) y la enzima aromatasa (involucrada en la síntesis de estrógenos) (Andreucci et al. 2016). Existe un complejo entrecruzamiento entre las vías de ER y HER2 que pueden ser la causa de la resistencia al tratamiento (Pinhel et al. 2012).

### **1.2.2 Cáncer de ovario**

El cáncer epitelial de ovario es una de las enfermedades ginecológicas con mayor letalidad, teniendo una supervivencia de 5 años para los casos en los que se diagnostica en un estado avanzado de la enfermedad. Es por esto por lo que la búsqueda de herramientas dirigidas a

una detección precoz es uno de los puntos clave en la investigación de este tipo de cáncer. Una posible diana en ese sentido, es la glicoproteína CA125, que está sobreexpresada en el 80% de los casos de cáncer de ovario. Sin embargo, esta sobreexpresión sólo ocurre en los estadios avanzados de la enfermedad y no en los iniciales. Además, está presente en situaciones normales no patológicas, como es durante el embarazo y la menstruación (Kurosaki et al. 2016).

Sin embargo, el receptor alfa de folato (FRA) es una molécula de alta afinidad por el ácido fólico que se encuentra unida a las membranas y parece encontrarse sobreexpresada en el cáncer de ovario. La expresión de esta proteína se ha visto elevada también en otros tipos de cáncer como el de útero, el de mama o el de pulmón, por lo que es una importante diana en el desarrollo de nuevas estrategias no sólo de diagnóstico del cáncer, sino también del tratamiento de la enfermedad.

### **1.2.3 Cáncer colorrectal**

Otro de los tipos de cáncer más extendidos es el cáncer colorrectal (CCR). En España, se estiman 25.000 nuevos casos y 13.000 muertes al año producidas por este cáncer. Su incidencia y mortalidad está marcada por la localización anatómica del tumor y sus características anatomopatológicas. En los últimos años, para su diagnóstico y pronóstico se han empleado marcadores moleculares tales como el estado mutacional de KRAS, el estudio de la inestabilidad de microsatélites (MSI) o la expresión de enzimas del sistema MMR (Mismatch-repair enzymes) (Inamura et al. 2016; Vilorio-Marqués et al. 2015).

Además, en el cáncer colorrectal metastásico (mCRC) se ha observado una desregulación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) que conlleva la activación de la ruta de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK). Por ello, de manera similar a lo que ocurría en el cáncer de mama, es común el empleo de anticuerpos monoclonales, en este caso anti-EGFR como el cetuximab y pantitumumab que se unen al dominio extracelular del receptor (Rowland et al. 2016; Manning et al. 2008).

## **1.3 Tratamientos actuales del cáncer**

La elevada incidencia y mortalidad de la enfermedad ha forzado al diseño y mejora de los tratamientos actuales de forma que sean más efectivos y sus efectos adversos disminuyan en

gran medida. A día de hoy existen tratamientos específicos como es el caso de la hormonoterapia, pero los más extendidos y empleados siguen siendo la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia.

### **1.3.1 Cirugía**

La cirugía fue la primera forma de combatir la enfermedad, antes de la llegada de la radioterapia y la quimioterapia. Actualmente, este método ha avanzado de forma significativa, llegando a disminuir el daño en el tejido afectado siendo mucho menos invasiva y eliminando los tumores de una forma más efectiva. El empleo de esta técnica depende tanto de las características del tumor como el lugar en el que se encuentra. En el caso del cáncer de mama se ha mejorado notablemente en diversos aspectos. Por ejemplo, el mapeo linfático, permite conocer la afectación de los ganglios sin necesidad de extraerlos. En el caso del cáncer colorrectal, el empleo de nuevas técnicas como la cirugía laparoscópica ha mejorado los resultados respecto a las antiguas cirugías abiertas produciendo menores infecciones de las heridas, un menor periodo de ingreso hospitalario y un aumento de la calidad de vida tras el primer mes después de la operación (Ota 2003).

A pesar de estas mejoras en la cirugía oncológica, todavía existen muchos casos en los que no es suficiente para el tratamiento de la enfermedad, teniendo que aplicarse otros abordajes, como la radioterapia y la quimioterapia neoadyuvante.

### **1.3.2 Radioterapia**

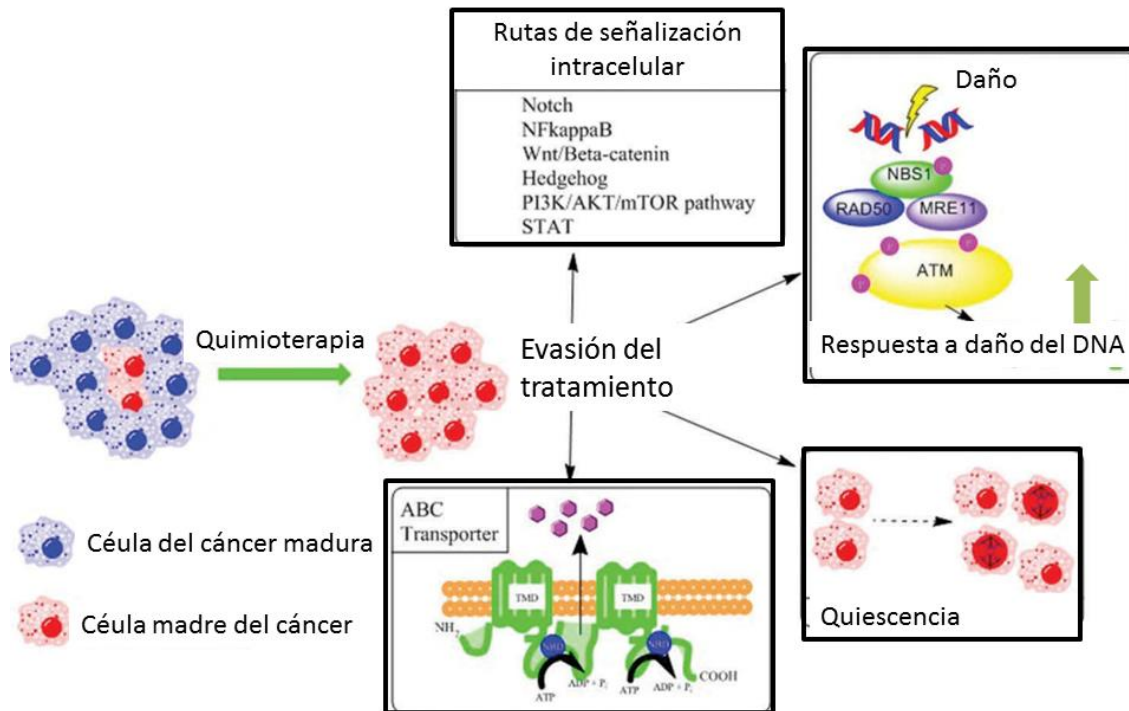
La radioterapia es la forma de tratamiento que trata de forma local a la enfermedad intentando eliminar las células cancerosas mediante radiaciones, que se pueden administrar de dos formas diferentes dando lugar así a la radioterapia externa y a la radioterapia interna. Uno de los problemas asociados a esta forma de tratamiento son los efectos secundarios, en cáncer de mama se han observado afectaciones cardíacas ya que, aunque se administra de forma local puede llegar a afectar a otros órganos (Taylor & Kirby 2015). También existen evidencias de la aparición de tumores secundarios tras la exposición a elevadas dosis de radioterapia (Chargari et al. 2016). Aunque estos efectos secundarios dependen del tipo de tumor y de la zona en la que se localiza, el cansancio y las reacciones en la piel son comunes a todos los cánceres tratados mediante radioterapia.

### 1.3.3 Quimioterapia

La quimioterapia se basa en el empleo de fármacos cuyo objetivo es destruir a las células que forman el tumor e impedir que estas células consigan ocupar otros tejidos. Aunque la quimioterapia como se entiende actualmente comenzase tras la Segunda Guerra Mundial, se tiene conocimiento del empleo de plantas y otras sustancias naturales en el tratamiento de la enfermedad (Papac 2001). El término quimioterapia abarca a una gran cantidad de sustancias cuya función final es la muerte de las células en división continua, en lo que se diferencian unos fármacos de otros es el método por el que impiden esta división.

A pesar de la efectividad de la quimioterapia, los fármacos llegan a todas las células del organismo ejerciendo su función tanto en las células tumorales como en las células sanas. La acción sobre las células sanas es lo que provoca la aparición de efectos secundarios. Estos efectos adversos pueden estar relacionados con el tracto digestivo como son las alteraciones en el gusto. Puede producirse la falta de percepción del gusto (ageusia) o un aumento o disminución de este sentido (hipogeusia o hipergeusia), que afectan a un 45-84% de los pacientes tratados con quimioterapia. Ello suele tener como consecuencia la pérdida de apetito y disminución de la ingesta de nutrientes que conlleva a un empeoramiento de la calidad de vida (Ijpma et al. 2015). A pesar del desarrollo de las terapias antieméticas, las náuseas son otro de los efectos adversos que padecen los pacientes tratados con quimioterapia que más afectan a su calidad de vida (Abe et al. 2016). La quimioterapia se dirige a las células en rápida división, por lo que los queratinocitos del pelo mueren por apoptosis y esto conlleva la característica pérdida del pelo (alopecia) además de afectar a la médula ósea haciendo disminuir la producción tanto de plaquetas como de linfocitos (Botchkarev & Sharov 2016).

Además de todos los efectos adversos a los que se ha hecho mención en el apartado anterior, uno de los factores más limitantes a la hora de administrar agentes quimioterapéuticos son los mecanismos de resistencia a fármacos. Tras las primeras administraciones efectivas de los antineoplásicos, las células tumorales en general y las células madre del cáncer (CMC) en particular, expresan genes cuya función es la defensa celular frente a los fármacos. Esta resistencia a fármacos se produce mediante activación de vías de señalización anti-apoptóticas, un aumento de la eficiencia de la reparación del DNA, una naturaleza quiescente o de proliferación lenta y reprogramación de los procesos metabólicos y un alto nivel de expresión de transportadores ABC de eflujo de fármacos (figura 5).



**Figura 5. Mecanismos de resistencia a fármacos (McIntosh et al. 2016)**

Uno de los mecanismos de resistencia a fármacos más estudiado es el de los transportadores ABC (*ATP binding cassette*). Estas proteínas transmembrana tienen una función transportadora para la que requieren ATP. Dependiendo del sentido del transporte pueden ser importadores, presentes en células procariontas, o exportadores, presentes en células procariontas y eucariotas.

La función de estas estructuras es demasiado extensa, llegando a transportar una gran cantidad de sustratos de naturalezas muy diversas como iones, moléculas anfipáticas, moléculas orgánicas hidrofóbicas e incluso grandes proteínas. Esto hace que los transportadores ABC estén implicados en numerosos procesos (Theodoulou & Kerr 2015).

La estructura general de estos transportadores está compuesta por 4 dominios. Dos de los cuales se encuentran en el citoplasma y se conocen como dominios de unión a nucleótido (NBD) y son los encargados de unirse a los nucleótidos de los que obtendrán la energía para poder realizar su función y a otros dominios transmembrana (TMD). Una vez que se produce la hidrólisis del ATP, se induce un cambio conformacional que se transmite a los dominios transmembrana, favoreciendo el paso de distintas sustancias a través de la bicapa lipídica.

A pesar de la gran cantidad de transportadores ABC existente en procariontes, se va a prestar especial atención a los presentes en eucariontes y, más concretamente, en el humano. En humanos se conocen 49 genes que codifican para transportadores ABC que a su vez se clasifican en 7 familias diferentes (A-G) dependiendo de su secuencia de aminoácidos y de sus dominios proteicos: ABCA (13 miembros), ABCB (11 miembros), ABCC (11 miembros), ABCD (4 miembros), ABCE (1 miembro), ABCF (3 miembros) y ABCG (5 miembros) (El-Awady et al. 2017).

La función de estos transportadores varía en función del órgano en el que se encuentren y su expresión anómala, tanto aumentada como disminuida, está relacionada con ciertas patologías.

Existen varios transportadores implicados repartidos en las diversas familias que son responsables de los mecanismos de resistencia a fármacos (tabla 2).

**Tabla 2. Genes responsables de la resistencia múltiple a fármacos en humanos**

FAMILIA	GEN	ALIAS	FUNCIÓN
<b>ABCA</b>	ABCA2	ABC2	Resistencia a múltiples fármacos
<b>ABCB</b>	ABCB1	MDR1 P-gp1	Resistencia a múltiples fármacos (MDR). En la barrera hematoencefálica impidiendo la entrada al cerebro de fármacos.
	ABCB4	MDR3 P-gp3	Resistencia a múltiples fármacos (MDR). Se localiza en hígado, implicado en el transporte de fosfatidilcolina biliar.
<b>ABCC</b>	ABCC1	MRP1	Proteína 1 de resistencia a múltiples fármacos.
	ABCC2	MRP2, cMOAT	Proteína 2 de resistencia a múltiples fármacos. Transportador multiespecífico de aniones orgánicos.
	ABCC3 ABCC4 ABCC5 ABCC10	MRP3 MRP4 MRP5 MRP7	Proteínas de resistencia a múltiples fármacos.
<b>ABCG</b>	ABCG2	MXR BCRP	Resistencia a múltiples fármacos (MDR). Confiere resistencia a antineoplásicos como mitoxantrona, topoecan y doxorubicina.

De todos estos genes implicados en la resistencia a fármacos, son tres los transportadores principales relacionados con esta función: ABCB1 (p-gp), ABCC1 (MRP) y ABCG2 (BCRP).

Para hacer frente a los mecanismos de resistencia a fármacos se han empleado distintas estrategias como es el uso de inhibidores. Los inhibidores de estas estructuras se clasifican en tres generaciones en función de la afinidad, especificidad y toxicidad: la primera generación se caracteriza por una escasa afinidad, lo que hace que se requiera una dosis muy elevada de los mismos y que se produzca una toxicidad inaceptable. La segunda generación tiene una especificidad mayor que los de la primera generación y menor toxicidad pero pueden interaccionar con otros fármacos y otros transportadores ABC. Con la tercera generación se ha conseguido mejorar la especificidad de los mismos (C. Y. Chen et al. 2016; Vilorio-Marqués et al. 2015).

Los problemas asociados al empleo de inhibidores de las proteínas ABC en la terapia contra el cáncer como son los efectos tóxicos y posibles interacciones con otros transportadores y otros fármacos, ha conducido al diseño de nuevas estrategias para intentar evadir estos mecanismos. Ejemplo de ellas es el caso de la terapia génica o el desarrollo de nuevos sistemas de fármacos que no sean reconocidos por estas estructuras.

#### **1.4 Doxorubicina**

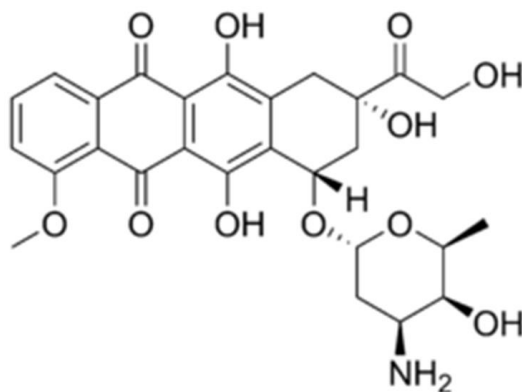
Las antraciclinas son una de las familias de agentes quimioterapéuticos más efectivos en el tratamiento de enfermedades oncológicas que incluyen la leucemia, linfomas y tumores sólidos (Fulbright et al. 2015). La daunorrubicina, la epirubicina y la doxorubicina pertenecen a esta familia de antraciclinas. La doxorubicina (DOX) fue aislada originalmente de *Streptomyces peucetius var. caesius*. El uso de este fármaco se ha extendido durante décadas, gracias a su amplio espectro de actuación sobre distintos tipos de cáncer tanto infantiles como de adultos, tales como el cáncer de mama, la leucemia, linfomas no-Hodgkin, enfermedad de Hodgkin, tumores sólidos infantiles y sarcomas (Duan et al. 2012). Este agente quimioterapéutico suele administrarse combinado con otros fármacos y en distintas dosis, como puede observarse en la tabla 3.



**Tabla 3. Protocolos actuales de administración de Doxorrubicina combinada con otros fármacos en función de la enfermedad a tratar. Dónde: (D) días de terapia; (Do) dosis; (Di) disolvente; (V) Volumen; (T) tiempo y (R) ruta de administración**

INDICACIÓN	PROTOCOLO	FÁRMACOS	Do mg/m <sup>2</sup>	Di	V	T	R
<b>HEMATOLOGÍA</b>							
<b>Linfomas no Hodgkin (NHL)</b>	CHOP+ RITUXIMAB	Ciclofosfamida, vincristina, prednisona, rituximab	50	0,9% NaCl	250	1h	i.v.
<b>Linfomas Hodgkin</b>	ABVD	Bleomicina, vinblastina, dacarbacina	25	0,9% NaCl	50	1h	i.v.
	BEACOPP	Ciclofosfamida, vincristina, prednisona, etoposide, procarbicina, bleomicina	35	0,9% NaCl	250	1h	i.v.
	BEACOPP BASIS	Ciclofosfamida, vincristina, prednisona, etoposide, procarbicina, bleomicina	25	0,9% NaCl	250	30'	i.v.
<b>ONCOLOGÍA</b>							
<b>Cáncer de pulmón</b>	EVANS	Ciclofosfamida, vincristina	50	0,9% NaCl	500	1h	i.v.
<b>Cáncer de mama</b>	CICLOFOSFAMIDA/DOXORRUBICINA LIPOSOMAL	Ciclofosfamida	60	0,9% NaCl	500	1h	i.v.
<b>Cáncer gastrointestinal</b>	DOXORRUBICINA	-	60	0,9% NaCl	250	1h	i.v.
<b>Sarcoma de Ewing</b>	EVAIA	Vincristina, etoposido, ifosfamida, mesna, actinomicina D	20	0,9% NaCl	250	4h	i.v.
<b>Sarcoma de tejidos blandos</b>	EORTC	Ifosfamida	75	0,9% NaCl	250	1h	i.v.
	CYVADIC	Ciclofosfamida, vincristina, dacarbacina	50	0,9% NaCl	250	1h	i.v.
	MAID	Ifosfamida, dacarbacina	20	0,9% NaCl	500	4h	i.v.

Las propiedades características de la doxorrubicina se las confiere su estructura, ya que está compuesta por un anillo tetracíclico con dos grupos quinona-hidroquinona adyacentes al anillo y una daunosamina, un azúcar que provoca que sea soluble en agua a pesar del grupo tetracíclico que es insoluble en agua (figura 6).



**Figura 6. Estructura química de la doxorrubicina**

Aunque todavía no está completamente esclarecido el mecanismo de acción de la doxorrubicina, se han postulado distintas hipótesis por las que desencadena la muerte por apoptosis. Esta se debe a un conjunto de eventos que incluyen la intercalación en el DNA, la producción de especies reactivas de oxígeno, la alquilación de macromoléculas, la peroxidación lipídica, el daño de la membrana celular, la producción de ceramida e inducción de p53 (Ashikawa et al. 2004). Parece que el mayor efecto que produce la doxorrubicina es la intercalación con el DNA: la doxorrubicina es capaz de intercalarse en el DNA y unirse a la DNA-polimerasa lo que impide la síntesis de DNA. Aunque también impide la síntesis de RNA por unión a la RNA-polimerasa, la doxorrubicina parece tener una afinidad mayor por la DNA-polimerasa (Shim et al. 2009).

A pesar del amplio espectro de acción de la doxorrubicina y de sus beneficios en el tratamiento de numerosos tumores, su uso está limitado debido a las consecuencias negativas que derivan de él. Además de los efectos adversos asociados a cualquier tipo de agente quimioterapéutico, que puede deberse a la producción de especies radicales de oxígeno (ROS) que conlleva apoptosis y muerte celular y de los que se han hablado previamente, la doxorrubicina y sus metabolitos (como es el doxorubicinol) producen cardiomiopatía (Sakai-Kato et al. 2010). Esto se debe a que los cardiomiocitos son células muy sensibles a los incrementos de especies reactivas de oxígeno (ROS) de manera que la presencia de la doxorrubicina les puede afectar de manera especial. La doxorrubicina también afecta al

cerebro, hígado y riñones (Meredith and Dass 2016; Al-Abd et al. 2010). Pero no sólo la doxorubicina es tóxica, también lo son sus compuestos secundarios. La doxorubicina se metaboliza rápidamente en hígado hasta dar compuestos secundarios como es el caso del doxorubicinol, el cual juega un papel importante en el desarrollo de la citotoxicidad (Ahmed et al. 2009).

La elevada capacidad antitumoral de la doxorubicina, combinada con sus peligrosos efectos adversos han llevado a la búsqueda de nuevos sistemas de liberación del fármaco y de nuevas rutas de administración con el fin de aumentar la selectividad por los tejidos tumorales y disminuir los efectos secundarios. Actualmente existen diversas formas de administración de la doxorubicina basada en sistemas nanométricos que han recibido la aprobación de la agencia de Administración de Fármacos y Alimentos (FDA) como son el Doxil® y Ambisome® (Y. Huang et al. 2016). El Doxil®, se trata de un sistema de liberación controlada basado en liposomas encargados de encapsular el fármaco. Esto se ha empleado en la administración del fármaco para el tratamiento de diversos tumores sólidos o del sarcoma de Kaposi relacionado con el desarrollo del SIDA. Esta forma de administración ha demostrado en ensayos clínicos, una disminución de los efectos adversos con respecto a la doxorubicina libre (Rafiyath et al. 2012). Sin embargo, todavía no se ha llegado a una liberación específica en el lugar del tumor que proporcione la selectividad necesaria y disminuya los efectos secundarios asociados al fármaco.

## 2. NANOMEDICINA

La nanotecnología, definida como el estudio de materiales y sus características físicas, químicas, bioquímicas y biofísicas en el tamaño de la nanoescala, abarca un gran número de disciplinas científicas y se ha extendido a distintos sectores industriales como son el electrónico, el químico, el farmacéutico, el cosmético,... (Satalkar et al. 2016; Mirabile et al. 2014).

En 2004 la Fundación Europea de Ciencia definió la nanomedicina como “la ciencia y tecnología del diagnóstico, tratamiento y prevención de enfermedades y traumatismos, de dolores, y de la preservación y mejora de la salud humana, empleando herramientas moleculares, así como el conocimiento molecular del cuerpo humano” (Sweeney 2015). La nanomedicina se basa en el empleo de las propiedades de los materiales a pequeña escala (una escala inferior a los 1000 nm), que difieren en gran medida de las propiedades de los

mismos materiales a gran escala. Esto ocurre ya que los eventos en el cuerpo humano ocurren a pequeña escala, de forma que los nanomateriales son capaces de alcanzar zonas, atravesar barreras e interactuar con moléculas biológicas que de otra manera no sería posible como es el caso de la barrera hematoencefálica. Esta capacidad de los nanomateriales presenta numerosas ventajas y actualmente se investiga su empleo en liberación de fármacos o material genético, en terapia fototérmica, en inmunoterapia y en imagen (Chang et al. 2015; Gharpure et al. 2015).

Las tres principales aplicaciones de la nanomedicina se pueden dividir en:

### **1. Diagnóstico de enfermedades.**

El empleo de materiales en escala nanométrica, tiene como finalidad principal un descubrimiento de la enfermedad en un estadio más temprano que el que se consigue con las técnicas habituales, en el nivel molecular idealmente. Para conseguir este objetivo, la nanomedicina está buscando sondas capaces de atravesar las barreras fisiológicas y tomar medidas en paralelo con otras técnicas analíticas. El empleo de materiales nanoeléctricos puede mejorar también la sensibilidad de los sensores en los que se basan los métodos actuales bien establecidos (Bahadori & Mohammadi 2012). Estas nuevas herramientas de diagnóstico se emplean en la detección de enfermedades como patologías vasculares (Juenet et al. 2015), tumores o enfermedades relacionadas con el sistema nervioso como es el caso del Alzheimer (Nardo et al. 2016).

### **2. Medicina regenerativa.**

El Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos definió la medicina regenerativa como “el proceso de crear tejidos vivos y funcionales para reemplazar tejidos u órganos que han perdido su función debido a la edad, enfermedad, accidentes o defectos congénitos”. Con el avance de la nanomedicina, la regeneración de tejidos ha cobrado especial importancia y aparece como una posibilidad frente a los métodos tradicionales, como los trasplantes o prótesis, de los que derivan numerosos problemas de rechazo. El objetivo principal de esta técnica es el desarrollo de una matriz que pueda ser ocupada por las células del tejido que van a reemplazar de forma que se genere un nuevo tejido que no sea reconocido por el sistema inmune. Los

sistemas nanométricos que se han empleado en medicina regenerativa han sido entre otros nanopartículas, scaffolds con nanofibras o scaffolds modificados. Algunos de los tejidos en los que se ha empleado esta medicina regenerativa son: hueso, piel, cartílago, nervios, células del miocardio, dientes, hígado,...(Chaudhury et al. 2014)

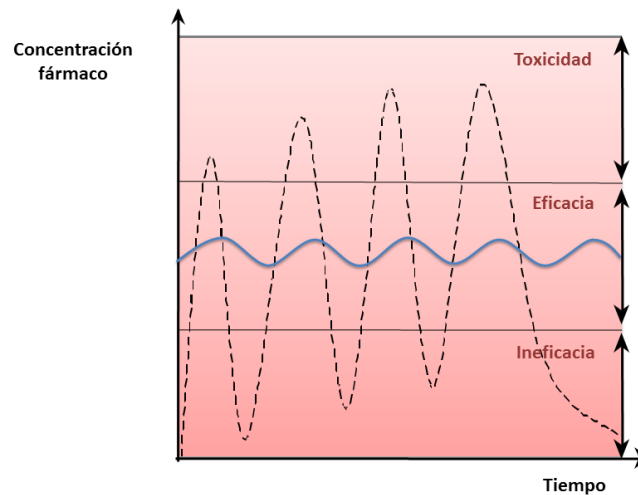
### **3. Liberación de fármacos.**

Las mejoras en el tratamiento de determinadas enfermedades empleando nanosistemas como sistemas de encapsulación y posterior liberación de fármacos se tratará ampliamente en el siguiente apartado.

#### **2.1 Liberación controlada de fármacos**

No sólo las propiedades del principio activo de un fármaco van a marcar la eficacia del tratamiento de una enfermedad, también depende de la dosis adecuada del fármaco, de su formulación y de la forma de administración del mismo. Esto significa que la biodisponibilidad de un fármaco y su forma de dosificación van a marcar la efectividad del principio activo que lo compone. El fármaco debe llegar a su diana de acción a la concentración adecuada y esta concentración debe mantenerse en el tiempo.

Uno de los principales problemas que se encuentran en los tratamientos convencionales de numerosas enfermedades, es el mantenimiento de la concentración del principio activo del fármaco. Esta concentración idónea del principio activo es la que se encuentra entre el mínimo de concentración mínima eficaz (CME), es decir, aquella a partir de la cual el fármaco es efectivo, y la concentración máxima tolerable (CMT), que es la concentración a partir de la cual el fármaco comienza a producir efectos tóxicos en el organismo (figura 7) (Mahmoodi et al. 2016).



**Figura 7: Esquema comparativo de la concentración de fármaco de un sistema de liberación controlada (línea azul) frente a un sistema de administración convencional de cuatro dosis (línea discontinua)**

Además del escaso control del mantenimiento de la concentración del principio activo en el organismo, los sistemas tradicionales de liberación de fármacos, es decir, aquellos cuyos materiales están desarrollados a gran escala, presentan una serie de inconvenientes como son una baja estabilidad *in vivo*, una baja solubilidad y poca absorción intestinal.

Es por esto, que la nanomedicina se presenta como una alternativa en liberación controlada de fármacos. Algunas de las mejoras que pueden producirse gracias a la inclusión del fármaco en sistemas nanométricos son (Szabo & Zelko 2015):

1. Aumento de la solubilidad del fármaco. Los fármacos insolubles en disolventes acuosos presentan como desventaja los problemas asociados a su distribución. Esto hace que el hecho de que puedan ser encapsulados en sistemas de liberación controlada y favorecer su biodistribución.
2. Una mejora en la inclusión del fármaco en las células, facilitando así su llegada a la diana de acción.
3. Disminución de los efectos secundarios de los fármacos. Esta característica es realmente importante en el tratamiento del cáncer ya que, como se ha desarrollado previamente, los agentes quimioterapéuticos afectan a otros órganos por la distribución no específica en el organismo.

## 2.2 Sistemas nanométricos de liberación controlada

Los nanotransportadores han sido estudiados como transportadores de fármacos y otras moléculas bioactivas desde hace más de 35 años. Como se ha nombrado anteriormente, el Doxil®, como sistema de liberación controlada de doxorubicina, fue el primer nanosistema comercializado y, a partir de él, se han aprobado numerosos tratamientos basados en la nanomedicina. A pesar de existir diferentes sistemas nanométricos de liberación controlada, hay ciertos requerimientos comunes a todos ellos que deben cumplir para ser considerados aptos para su empleo en la encapsulación de fármacos (Uhrich et al. 1999).

Como ocurre con el resto de fármacos, los nanosistemas deben estar sometidos a una regulación y monitorización que incluya su caracterización, estudios de toxicidad y comprobaciones clínicas antes de su comercialización y administración a pacientes.

A continuación se presentan algunos de los sistemas nanométricos más empleados como sistemas de liberación controlada.

### 2.2.1 Dendrímeros.

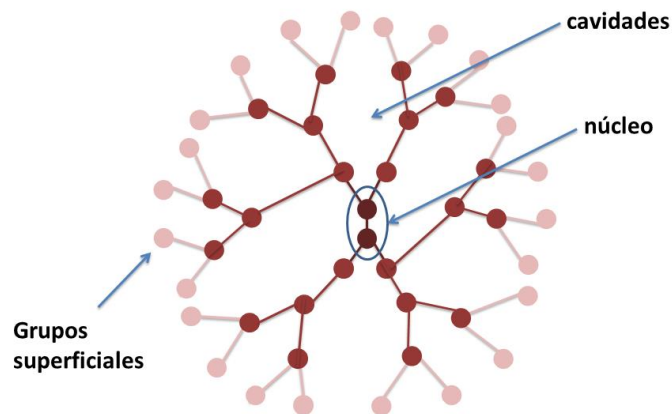
Los dendrímeros son partículas sintéticas que se caracterizan por tener un gran número de puntos de ramificación. Estas estructuras se forman a partir de un núcleo iniciador del cual salen las ramificaciones que finalizan en grupos superficiales. Los dendrímeros se sintetizan mediante repetición de una reacción química desde un punto (el núcleo). El número de capas de la superficie del dendrímero se conoce como número de generación (Kalomiraki et al. 2015).

Las características físico-químicas de estos nanosistemas son (Singh et al. 2016):

- Estructura globular compacta.
- Sintetizados en un único paso.
- Se tiene un elevado control estructural de los mismos.
- Presentan una estructura bien definida.
- Unen moléculas con tamaños, pesos moleculares y formas bien definidas.

- Presentan cavidades en las que se pueden alojar moléculas (figura 8)

Aunque la capa exterior está formada por grupos funcionales solubles en agua, el núcleo y las ramificaciones son responsables de la unión a fármacos lipofílicos, mejorando su solubilidad. Estas características les hacen buenos sistemas de liberación controlada, además de a fármacos pueden encontrarse unidos a otras moléculas como anticuerpos, hormonas o a otras estructuras como los liposomas, pero también se emplean en el diagnóstico de enfermedades, principalmente en el caso de diagnóstico de tumores. La superficie de los dendrímeros permite la unión de moléculas fluorescentes o agentes de contraste ionizados (Sharma et al. 2016).



**Figura 8. Representación esquemática de la estructura de un dendrímero**

### 2.2.2 Liposomas

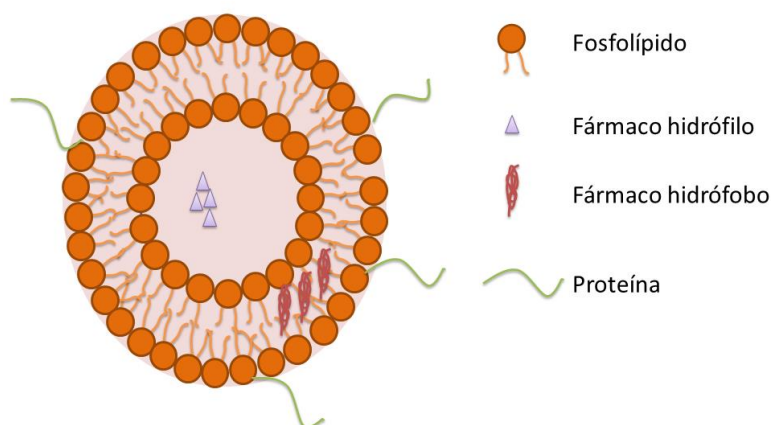
Los liposomas son estructuras formadas por bicapas lipídicas que encapsulan un compartimento acuoso, el número de bicapas es variable ya que pueden estar formados por una única bicapa o varias colocadas de forma concéntrica (Bozzuto & Molinari 2015). Aunque inicialmente las bicapas lipídicas estaban formadas únicamente por lípidos naturales, actualmente pueden implicar tanto lípidos naturales como sintéticos y surfactantes. Su formación se debe a un autoensamblaje de las moléculas que los forman. Al ser de naturaleza



anfipática, en contacto con un disolvente acuoso se disponen formando esferas de un tamaño no más pequeño de 30 nm debido al impedimento estérico.

El empleo de liposomas como sistemas de liberación controlada se basa, principalmente, en la capacidad que tienen de incluir en su interior moléculas tanto hidrofóbicas como hidrofílicas, las moléculas de naturaleza hidrofílica se posicionarían en el núcleo acuoso mientras que las hidrofóbicas se unirían en la bicapa lipídica (figura 9). Otra de las ventajas que presentan estos sistemas para la administración de fármacos es su capacidad de incorporar varias sustancias y sus características similares a las de las membranas celulares, de manera que facilitaría su incorporación al medio celular.

Para la formación de liposomas de tamaño tan pequeño es necesaria la transferencia de grandes cantidades de energía, por sonicación o por extrusión en la mayoría de los casos (Van Der Meel et al. 2014). Las propiedades físico químicas de los liposomas son variadas en función del material que se emplee en su síntesis y sus características como tamaño, carga superficial, sensibilidad al pH...Por lo que estas propiedades se pueden modificar alterando los materiales que los componen (Eloy et al. 2014). Los liposomas pueden ser clasificados dependiendo del método de preparación (evaporación de fase reversa o por extrusión), por tamaño (pequeño, intermedio o grande) y por lamellaridad (vesículas uni, oligo y multilamelares) (Bozzuto & Molinari 2015).



**Figura 9. Representación esquemática de la estructura de un liposoma como sistema de liberación controlada de fármacos**

### **2.2.3 Quantum dots**

En un primer momento se identificaron los Quantum dots como nanocristales semiconductores inorgánicos sintetizados a partir de los elementos de los grupos III-V y II-VI de la tabla periódica, pero el desarrollo de la nanotecnología ha hecho necesario redefinir el término e incluir nanopartículas con base de carbono, silicio, oro y sulfato de molibdeno entre otros materiales. Estos quantum dots tienen un tamaño extremadamente pequeño (inferior a 10 nm) por lo que pueden interactuar con estructuras biológicas.

A pesar del empleo de nuevos materiales, son los primeros quantum dots (originados a partir de los elementos de los grupos III-V y II-VI de la tabla periódica) los que ocupan un papel principal en las aplicaciones biomédicas. Además, estos quantum dots tienen propiedades físico-químicas que los diferencian de otros tipos de nanopartículas.

El desarrollo de nuevos quantum dots conlleva la investigación de los posibles efectos secundarios que se podrían producir en el ser humano cuando se encuentra expuesto a ellos, como son los estudios de Yonghui Lu y col. en los que se estudia posibles efectos citotóxicos en hepatocitos, tras el tratamiento con quantum dots basados en cadmio, selenio y zinc (Lu et al. 2016). En el uso en medicina, su síntesis se realiza en múltiples pasos asegurando su solubilidad y biocompatibilidad (Volkov 2015).

### **2.2.4 Nanotubos de carbono**

En 1991, Sumio Iijima describió la síntesis de los nanotubos de carbono (CNTs) mediante el método de evaporación por descarga, presentando unas partículas de tamaño muy pequeño pero con un gran potencial (Iijima 1991). Desde ese momento han sido numerosas las investigaciones para explorar su posible uso en diferentes áreas de la ciencia, desde la tecnología hasta la medicina (Ma & Agarwal 2016).

Sus propiedades físicas únicas, semiconductores casi unidimensionales capaces de emitir fluorescencia en el infrarrojo cercano, les hacen especialmente atractivos para diagnóstico de imagen en biomedicina. Además, las impurezas de metales presentes en estas estructuras les permiten ser empleados en resonancia magnética, aumentando el contraste (Deng et al. 2016; Gong et al. 2013). Al tratarse de estructuras ultraligeras, tubulares, con una gran superficie de contacto y no inmunogénicos, son también unos firmes candidatos para ser

empleados como sistemas de liberación de fármacos (Sajid et al. 2016; Mehra & Palakurthi 2016).

### **2.2.5 Nanopartículas sólidas**

Las nanopartículas se definen como dispersiones de partículas sólidas con un rango de tamaño entre los 10 y los 1000 nm. Las nanopartículas son capaces de encapsular, unir covalentemente o adsorber moléculas en su superficie, lo que las permite ser empleadas como sistemas de liberación controlada de fármacos. Dependiendo del método de preparación de las nanopartículas se pueden obtener distintas formas de nanopartículas: nanocápsulas o nanoesferas (Talevi et al. 2014).

#### **1. Nanocápsulas**

Las nanocápsulas se definen como sistemas vesiculares en los cuales el fármaco es confinado en un único compartimento rodeados de una capa polimérica.

#### **2. Nanoesferas**

Las nanoesferas están compuestas por una matriz en la que el fármaco se encuentra de forma dispersa, al contrario de lo que se veía en las nanocápsulas. En este caso el fármaco puede encontrarse atrapado, encapsulado, químicamente unido o adsorbido en toda la matriz que forma el sistema. Estas nanopartículas suelen tener un tamaño de entre 100 a 1000 nm.

En la práctica, la diferencia entre ambas formas de las nanopartículas son: la cantidad de polímero que forma la nanopartícula y la naturaleza del fármaco que incorporan, en el caso de las nanocápsulas, al estar confinado en un único compartimento y no encontrarse en contacto con el medio, pueden incorporar fármacos de carácter hidrofóbico. En contraposición, las nanocápsulas son estructuras más frágiles que las nanoesferas (Letchford & Burt 2007).

Las nanopartículas ofrecen ventajas frente a los liposomas como sistemas de liberación controlada. Estas ventajas son un incremento en la estabilidad del fármaco y una liberación más controlada.

Debido a sus posibles interacciones y aplicaciones en medicina es necesario conocer la forma en la que son captadas y la ruta que siguen estas nanopartículas en el organismo (Mahmoodi et al. 2016).

### **2.3 Nanopartículas en el tratamiento del cáncer**

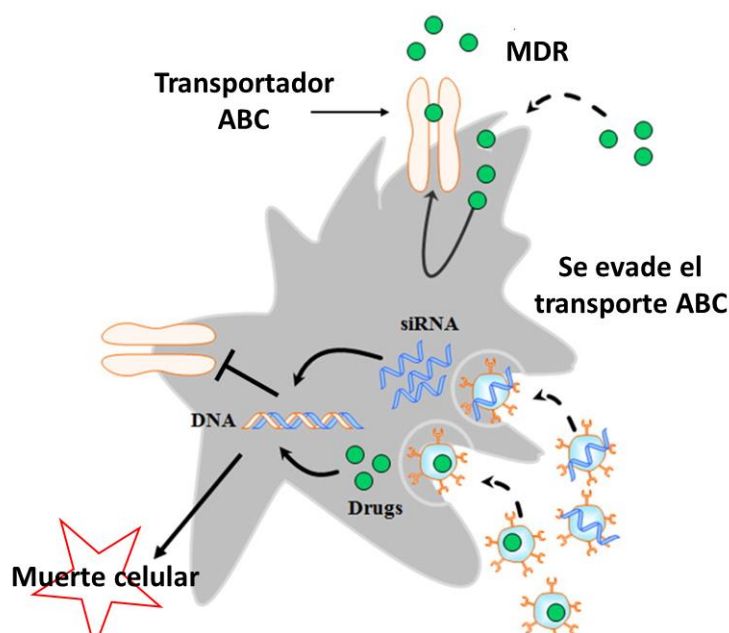
El hecho de que la quimioterapia sea una de las formas de tratamiento del cáncer más extendida y que presenta numerosos efectos adversos, ha llevado a la búsqueda de nuevas formas de tratamiento que hagan que disminuyan los efectos secundarios de los agentes quimioterapéuticos y que actúen de una forma más específica y mantenida en el tiempo sobre las células tumorales, haciendo que estos actúen de forma más efectiva y no se observen daños en otros órganos como se ha visto anteriormente.

El empleo de nanopartículas como sistemas de liberación controlada en el tratamiento del cáncer presenta numerosas ventajas como son (Gundogdu & Yurdasiper 2014):

1. La posibilidad de modificar el tamaño de la partícula y su superficie, de manera que pueda llegar al tumor por vehiculización pasiva o por vehiculización activa a la diana terapéutica.
2. La liberación controlada y mantenida en el tiempo de manera que la dosis del principio activo se mantenga entre los límites de eficiencia y toxicidad, así como la especificidad en el lugar de acción, eliminando la distribución del agente quimioterapéutico por el organismo.
3. Posibilidad de emplear materiales biocompatibles y fácilmente degradables que no afecten al organismo y se puedan eliminar con facilidad.
4. Aprovechamiento de las características fisiológicas del tumor como es el caso del efecto de permeabilidad y retención por el cual las nanopartículas quedan incluidas en el tumor durante más tiempo.
5. Aumentan la vida media del fármaco protegiéndolo de su degradación y aumentando su solubilidad en caso de fármacos poco solubles.

6. Distintas formas de administración del fármaco que incluyen la oral, nasal, parenteral,...

Como se ha expuesto en epígrafes anteriores, las células tumorales, tras una exposición prolongada a los fármacos pueden llegar a desarrollar mecanismos de resistencia (MDR) debido al reconocimiento de los fármacos por estructuras de las células, donde juegan un papel principal los transportadores ABC. Además del uso de inhibidores de estos transportadores, que se ha detallado anteriormente, o de fármacos dirigidos a la alteración de los lípidos de membrana o el bloqueo de la hidrólisis de ATP, se están desarrollando nuevas estrategias de evasión de esta respuesta celular menos agresivas y que produzcan menos efectos secundarios. De esta forma los sistemas nanométricos de liberación controlada y, más concretamente, las nanopartículas se presentan como uno de los posibles remedios a esta resistencia haciendo que se incorporen al interior celular por inclusión mediada por receptor y dependiente de energía o vía macropinocitosis sin llegar a producirse interacción por los transportadores ABC, liberando el fármaco en el interior y aumentando el tiempo del fármaco en el interior celular. Las propiedades específicas de las nanopartículas pueden contribuir sustancialmente al aumento de la concentración intracelular de agentes dirigidos a células madres del cáncer y, por lo tanto, a mejorar sus efectos citotóxicos. Esta forma de evasión de la resistencia a fármacos está representada en la figura 10.



**Figura 10. Incorporación de nanopartículas al interior celular evadiendo los mecanismos de resistencia a fármacos de los transportadores ABC (Milane et al. 2011)**

Actualmente, existen tratamientos quimioterapéuticos basados en nanopartículas para diferentes tipos de cáncer, además de los que se mantienen en investigación. Este es el caso de Abraxane®, sistema nanopartículado basado en albúmina que encapsula paclitaxel para el tratamiento del cáncer de mama y otros tumores sólidos (Kundranda & Niu 2015), o el de Panzem® empleado en el tratamiento del cáncer de ovario (Matei et al. 2009).

## **2.4 Vectorización de las nanopartículas**

Fue Paul Ehrlich quien, en el siglo XX, introdujo el concepto de “bala mágica” en la medicina, un tratamiento capaz de afectar únicamente a los tejidos enfermos sin afectar al resto de tejidos. De las ventajas en el empleo de nanopartículas frente al cáncer que se han comentado previamente, una de las más interesantes es la vehiculización de las mismas al tumor. Esta vehiculización se basa en la explotación de las características de las células tumorales que las diferencian de las células sanas. Actualmente existen dos tipos de vectorización de los nanosistemas, la pasiva y la activa.

### **2.4.1 Vectorización pasiva de las nanopartículas**

La vehiculización pasiva de las nanopartículas se basa principalmente en el proceso angiogénico y en el efecto de permeabilidad y retención derivado de él. Como quedó reflejado al detallar las características de los tumores sólidos, los requerimientos energéticos del tumor desencadenan un proceso de crecimiento de vasos sanguíneos conocido como angiogénesis. Debido al rápido proceso de formación de los nuevos vasos sanguíneos, se produce una vasculatura débil y con poros de gran tamaño. Esta característica es fundamental en el tratamiento con nanosistemas de liberación controlada y concretamente con nanopartículas, ya que pueden atravesar estos poros gracias a su tamaño que, en el caso de tejidos sanos no pueden atravesar ya que no existen estas defenestraciones. Adicionalmente, el hecho de que no se produzca un drenaje linfático en paralelo a la formación de los vasos sanguíneos, hace que la eliminación tanto de los materiales de desecho como de las nanopartículas sea deficiente, quedando retenidas en el tumor donde liberan el fármaco encapsulado aumentando su tiempo de acción. Es decir, la vectorización pasiva de las nanopartículas se basa en sacar partido al efecto de permeabilidad y retención aumentadas que se produce en los tumores sólidos (Podduturi et al. 2013).

A pesar de que la vectorización pasiva es capaz de favorecer la acumulación de las nanopartículas en el entorno del tumor, no es capaz de mejorar la incorporación de las nanopartículas por parte de las células tumorales, para lo que ha surgido la vectorización activa.

#### **2.4.1.1 Vectorización activa de las nanopartículas**

Al igual que ocurre con la vectorización pasiva, la activa también aprovecha las características del tumor para obtener un tratamiento más eficaz que los convencionales. En este caso se trata de aumentar la incorporación de las nanopartículas frente a los sistemas cuya eficiencia se basa únicamente en la vectorización pasiva. Para ello se ha desarrollado la unión de moléculas a la superficie de los sistemas de liberación controlada cuyos receptores proteicos de membrana se encuentran sobreexpresados en las células tumorales. La interacción específica entre los receptores de membrana y los ligandos expuestos en la superficie de las nanopartículas favorece la internalización celular mediante la endocitosis mediada por receptor. La vectorización activa de las nanopartículas es una de las posibles estrategias para evadir los mecanismos de resistencia a fármacos.

Existen diversas moléculas capaces de ser unidas a las nanopartículas y ser reconocidas por los receptores de membrana de las células tumorales.

#### **2.4.1.2 Anticuerpos**

La especificidad de los anticuerpos ha sido una de las razones por las que se han empleado durante mucho tiempo en medicina con propósitos de tratamiento y diagnóstico. Esta especificidad hace que los anticuerpos fuesen una de las primeras estructuras empleadas para vectorizar sistemas de liberación controlada. La selectividad y afinidad de unión de los anticuerpos se debe a su estructura con dos epítopos. El primer anticuerpo aprobado por la FDA para aplicaciones clínicas fue mAb Muromonab CD3, de nombre comercial OrthoClone OKT3®, que se trata de un anticuerpo murínico. Actualmente, la FDA aprueba el uso de otros anticuerpos en el tratamiento del cáncer (Gasser & Waaga-Gasser 2016).

### 2.4.1.3 Factor epidérmico de crecimiento humano 2 (receptor HER2)

Los factores de crecimiento epidérmico humano son una familia de tirosin-quinastas implicadas en diversos procesos celulares como son la proliferación, diferenciación y desarrollo. Esta familia está formada por cuatro miembros, todos ellos compuestos por una región extracelular, un dominio transmembrana y una región intracelular con un dominio con función tirosin-quinasa. Estos receptores reconocen al menos seis ligandos, entre los que se encuentran el EGF y el TGF- $\alpha$ , cuya unión al receptor desencadena numerosas respuestas celulares. Este receptor juega un importante papel en la proliferación, apoptosis, desdiferenciación, angiogénesis, invasión y metástasis de las células tumorales. Aunque estos receptores se encuentran expresados en las membranas de células sanas pero en menor proporción que en células tumorales. Se ha observado que esta molécula se encuentra sobreexpresada en 40-80 % de cáncer NSCLC, un 20-25 % de cáncer de mama, en un 35-40 % de cáncer colorrectal y un 80-90 % de cáncer de cabeza y cuello...(W. Li et al. 2016)

El caso del factor de crecimiento epidérmico humano II (HER2) es un ejemplo de esta familia y su implicación en cáncer. Apenas se encuentra expresado en las células normales de tejido adulto, pero se encuentra sobreexpresado un 25 % en cáncer de mama. Por ello, HER2 se ha planteado como una posible diana para la vehiculización activa de nanopartículas frente al cáncer de mama, empleando trastuzumab como anticuerpo, que también se ha empleado combinado con partículas supermagnéticas para el diagnóstico de este tipo de cáncer en estadios muy tempranos de la enfermedad.

### 2.4.1.4 Receptor de transferrina (TfR)

La transeferrina (Tf) se trata de una glicoproteína sérica cuya misión es el transporte de hierro a través del torrente sanguíneo y ser recogida por las células mediante la unión específica a receptores de transferrina, dando lugar a la internalización del hierro por endocitosis. El hierro es una molécula fundamental en la proliferación celular ya que se requiere como cofactor para la síntesis de DNA, lo que implica que la transferrina va a ser necesaria en el crecimiento tumoral.

Existen dos tipos de receptores de transferrina: el receptor de transferrina 1 (TfR1) que se encuentra expresado en todos los tejidos y el receptor de transferrina 2 (TfR2) que se encuentra expresado en hepatocitos pero también en la superficie de células tumorales. Esto



hace que el receptor de transferrina 2 sea una prometedora diana de acción frente al cáncer. Este receptor se expresa, en mayor medida, en glioblastoma humano debido a la necesidad de hierro que tienen las células cancerígenas para su proliferación. Este receptor tiene más afinidad por el hierro unido a transferrina que por el hierro libre y facilita la internalización de este hierro en el interior celular (Kang et al. 2015). Las nanopartículas recubiertas con el anticuerpo murínico 8D3 se dirigen específicamente a este receptor, lo que favorece su internalización (Cabezón et al. 2015).

Estudios realizados con liposomas que encapsulaban doxorrubicina demostraron que los liposomas que presentaban transferrina en su superficie eran sistemas de liberación de fármacos más específicos que aquellos que no unían transferrina en el tratamiento de tumores cuyas células sobreexpresaban el receptor de transferrina. Además se observó una disminución de la resistencia a fármacos ya que la incorporación de los liposomas se producía por endocitosis mediada por receptor (Bazak et al. 2014).

#### **2.4.1.5 Antígeno de membrana específico de próstata (PSMA)**

Este antígeno se encuentra presente tanto en las membranas de las células de cáncer de próstata como en la neovasculatura de la mayor parte de tumores sólidos no prostéticos (Tse et al. 2014).

Existen diversos anticuerpos antiPSMA, con distintas especificidades y afinidades por esta glicoproteína de membrana, que se han empleado en la vectorización de nanopartículas para el tratamiento del cáncer de próstata. El anticuerpo J591 es un ejemplo, ya que se ha investigado unido a nanopartículas metálicas, como una herramienta de diagnóstico del cáncer de próstata (Fung et al. 2016).

#### **2.4.1.6 Aptámeros**

Los aptámeros son fragmentos cortos de nucleótidos de cadena sencilla tanto de DNA como de RNA y oligonucleótidos, que se pliegan en estructuras secundarias y terciarias y que son capaces de unirse específicamente a proteínas. Su tamaño es variable, ya que pueden estar formados por cadenas de entre 20 y 80 nucleótidos. Al igual que ocurre con los anticuerpos, estas moléculas presentan una gran sensibilidad y especificidad de unión por lo que son considerados unos buenos agentes de unión, presentando la ventaja frente a estos de ser de

menor tamaño y, por tanto, permiten una mejor internalización celular. Otras de las características que les hace atractivos ligandos de unión en la terapia del cáncer son su estabilidad y su no inmunogenicidad. Como contraposición, el pequeño tamaño de estas moléculas favorece el aclaramiento renal por lo que se suelen emplear en combinación de moléculas de mayor tamaño como el polietilenglicol o el colesterol para impedir este aclaramiento (Alibolandi et al. 2015).

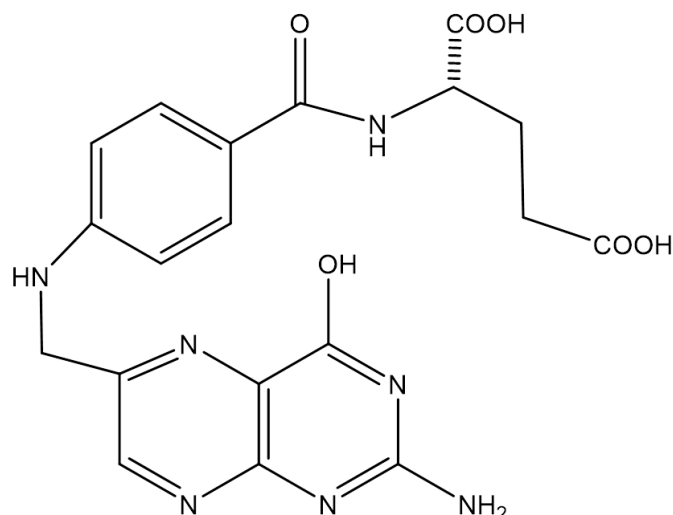
La síntesis de los aptámeros se realiza mediante un proceso denominado evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial, “Técnica de Evolución Sistemática de Ligandos por Enriquecimiento Exponencial” (SELEX), que se asegura que sean estructuras específicas. Para ello, el método SELEX comienza con una biblioteca aleatoria de 10<sup>13</sup>-10<sup>16</sup> ADN monocatenarios o ARN y utiliza un proceso iterativo que amplifica específicamente las secuencias que tienen alta afinidad de unión a las moléculas diana (Stoltenburg et al. 2007).

Todas estas características de los aptámeros hacen que sean buenos ligandos de la superficie de nanopartículas para el tratamiento de diversos cánceres como es el caso del de mama (Powell et al. 2017).

#### **2.4.1.7 Ácido fólico**

El ácido fólico es una vitamina de bajo peso molecular (441 Da) necesaria en células eucarióticas para la biosíntesis de las bases púricas y pirimidínicas, juega un papel principal en síntesis de DNA y RNA, procesos epigenéticos, proliferación celular y supervivencia (figura 11) (Champier et al. 2012).

Existen dos receptores de membrana capaces de reconocer al ácido fólico: un receptor reducido de baja afinidad presente en todas las células del organismo, y un receptor de fosfato glicosil-fosfatidil-inositol (FR) de elevada afinidad con una distribución más limitada en el organismo. Aunque el receptor de folato (FR) es capaz de internalizar el folato en cualquiera de sus dos isoformas (FR- $\alpha$  y  $\beta$ ), la mayor parte de los tejidos adultos incorporan esta vitamina mediante el receptor reducido de baja afinidad (De Boer et al. 2015).



**Figura 11. Estructura química del ácido fólico**

Es el receptor de folato de elevada afinidad el que se encuentra sobreexpresado en tejidos tumorales de mamífero. La isoforma  $\alpha$  se encuentra sobreexpresada en un 40 % de los tumores mientras que la  $\beta$  se encuentra en macrófagos y células hematopoyéticas malignas (Driver et al. 2016).

Las ventajas del empleo del ácido fólico en sistemas de liberación controlada son:

1. La estabilidad de la molécula que facilita el proceso.
2. Tiene una conjugación química sencilla y no produce inmunogenicidad.
3. Elevada afinidad que presenta por el receptor de folato de las células tumorales, lo que hace que se internalice con mucha rapidez.
4. El ácido fólico es requerido para procesos celulares por lo que no se destruye en los lisosomas sino que se almacena en endosomas o se libera al citoplasma, lo que supone una ventaja frente a los anticuerpos u otras moléculas.
5. Los receptores FR de las células normales son inaccesibles al flujo sanguíneo ya que se expresan en la capa luminal de las células epiteliales.

Existen numerosos ejemplos de nanosistemas que han empleado el ácido fólico como ligando en vehiculización activa de sistemas de liberación controlada, tales como

nanopartículas de oro (H. Li et al. 2016) o nanopartículas poliméricas (Junyaprasert et al. 2015).

### 3. BIOMATERIALES

El empleo de los materiales en medicina surgió como consecuencia de la necesidad de reemplazar tejidos u órganos dañados. Es por esto que la primera definición de biomaterial fue la de un material inerte que interacciona con sistemas biológicos. Sin embargo, la expansión de la medicina en el campo de los materiales no se reduce a la ingeniería de tejidos, sino que también abarca otros casos, como los sistemas de liberación controlada. Esto ha provocado la ampliación de la definición hacia una más amplia (Williams 2009).

Actualmente existen dos definiciones opuestas de biomaterial ambas aceptadas y cuya diferencia radica en el prefijo “bio”:

1. Material destinado a interactuar con los sistemas biológicos para evaluar, tratar, aumentar o reemplazar cualquier tejido, órgano o función del cuerpo
2. Material sólido que se produce en y se hace por los organismos vivos, tales como quitina, fibrina o hueso

Aunque ambas definiciones son válidas, la más aceptada en la actualidad es la primera, considerándose de esta manera también biomateriales a aquellos cuyo origen es sintético.

Los biomateriales, diseñados para su contacto con tejidos vivos deben cumplir el requisito de ser biocompatibles, esto significa que deben ser no-inflamatorios, inmunológicamente inertes y no carcinogénicos. Además, deben soportar el estrés físico como la compresión, la abrasión,...y ser capaces de adaptarse fácilmente al organismo, así como ser fácilmente esterilizables (Stynes et al. 2008).

La naturaleza del biomaterial va a depender de su aplicación. En el caso de implantes y sustitución de tejidos se requieren materiales no biodegradables tales como cerámicas, silicona o metales (metales como el hierro o el titanio han sido ampliamente utilizados para los implantes), mientras que los sistemas de liberación controlada estarán más enfocados a materiales degradables con el paso del tiempo (Stynes et al. 2008).

En el caso de sistemas de liberación de fármacos, los materiales más empleados son los polímeros. Entre ellos tenemos que distinguir los polímeros de origen natural y los polímeros de origen sintético.

### **3.1 Polímeros de origen natural**

Estos polímeros son aquellos sintetizados por sistemas vivos. Estos polímeros pueden ser fácilmente obtenidos de una fuente natural empleando técnicas sencillas y de bajo coste. Además de su biocompatibilidad, los polímeros naturales tienen la ventaja de presentar numerosos grupos químicos reactivos en su estructura, como el hidroxil, carboxil o grupos amino, que pueden ser modificados y enlazados a otras moléculas para mejorar sus propiedades.

Dentro de los polímeros naturales podemos distinguir dos grandes grupos en función de su naturaleza: los polisacáridos y los de naturaleza proteica.

#### **3.1.1 Polisacáridos**

Estos polímeros están compuestos por bloques de anillos de azúcares. Los más empleados son: la celulosa, la agarosa, el alginato y el quitosano (Ko et al. 2010).

##### **a. Celulosa**

Es el polímero natural más abundante en la naturaleza. Está formado por unidades de  $\beta$ -1,4-glucopiranosil. La celulosa se encuentra presente tanto en plantas como en bacterias; la fácil obtención y modificación de la celulosa la convierte en un material atractivo para la biotecnología. La celulosa está formada por un entramado de finas fibras que posee características como una gran capacidad de retención de agua, además de ser un polisacárido cristalino, modulable y tener una gran fuerza. A pesar de que en humanos la biodegradación está limitada por la carencia de enzimas específicas para ello, la celulosa es un material considerado biocompatible (Cacicedo et al. 2015).

Las aplicaciones de la celulosa como biomaterial son diversas como: recubrimiento de otros materiales, biadhesivos, liberación controlada de fármacos, regeneración de tejidos entre muchas otras.

#### **b. Agarosa**

La agarosa es un polisacárido formado por los copolímeros de 3,6-anhidro- $\alpha$ -L-galactosa y  $\beta$ -D-galactosa. Se obtiene de la pared celular de las algas rojas (Usov 2011).

Su empleo como biomaterial se debe a su biocompatibilidad y a ser no inmunogénico. Estas características convierten a la agarosa en un buen biomaterial como es el caso de los reemplazos de córnea (Ionescu et al. 2011).

Además de su empleo en biomedicina destaca su uso en investigación en electroforesis en geles de agarosa, donde también se ponen en contacto con biomoléculas.

#### **c. Alginato**

El alginato es un polisacárido aniónico natural obtenido de distintas especies de alga marrón, consistente en residuos de ácido  $\beta$ -D-manurónico (unidades M) y ácido  $\alpha$ -L-gulurónico (unidades G) unidos mediante enlaces glicosídicos 1:4. En función de la cantidad de cada uno de estos copolímeros se clasifica el alginato como MM; MG o GG que varía de unas algas a otras. En función de la cantidad de cada copolímero del alginato, las propiedades del material pueden variar. Aunque el peso del alginato puede variar en función de su tratamiento, el alginato comercial suele tener un peso molecular aproximado de 200.000 Da (Georg Jensen et al. 2013).

El alginato se obtiene mediante secado de las algas para después diluirlo en una solución ácida que elimine otros homopolisacáridos. Una vez terminado este paso y con el fin de convertir el alginato en su forma de sal insoluble, se trata con carbonato sódico a pH 10. El último paso de la extracción del alginato es su purificación (Fertah et al. 2014).

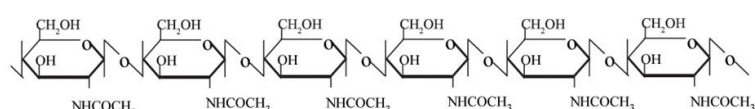
La propiedad físico-química más importante del alginato es su capacidad de uniones que permite la formación de geles (Harper et al. 2014). Otras características

como solubilidad del dependen de factores externos como el pH, la fuerza iónica del disolvente y de la presencia de iones.

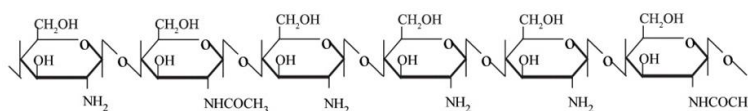
Uno de los principales problemas que puede afectar al empleo del alginato como biomaterial es su biocompatibilidad, ya que se han observado casos de respuesta inmune a compuestos con alginato debido a ciertos contaminantes que acompañan al polímero (Orive et al. 2006).

#### d. Quitosano

El quitosano es un polímero natural obtenido a partir de la quitina, que es uno de los polisacáridos más abundantes junto con la celulosa y está presente en numerosos organismos como en el exoesqueleto de los artrópodos o en la pared celular de hongos y levaduras. El quitosano se obtiene por desacetilación de la quitina, por lo que está formado por los copolímeros de glucosamina ( $\beta(1-4)$ 2-amino-2-desoxi-D-glucosa) y N-acetilglucosamina (2-acetamida-2-desoxi-D-glucosa) (figura 12). Este proceso de desacetilación hace que se obtengan diferentes formas de quitosano que se pueden clasificar en función de su peso molecular y en función de su grado de desacetilación. El grado de desacetilación es la relación entre los grupos N-acetil ( $-\text{NHCOCH}_3$ ) y la cantidad total de N-acetil y aminos ( $-\text{NH}_2$ ) que hay en la cadena polimérica (Gámiz-González et al. 2015; Lodhi et al. 2014).



**QUITINA**



**QUITOSANO**

**Figura 12. Estructura química de la quitina y el quitosano**

El quitosano se puede obtener por distintos métodos de desacetilación de la quitina, como son:

- **Desacetilación química:**

Este método se puede llevar a cabo mediante la adición de ácidos o bases a la quitina, ya que el enlace glucosídico es susceptible a ambos reactivos, pero se suele dar con mayor frecuencia la desacetilación alcalina. Existen dos métodos diferentes de desacetilación química, el método heterogéneo y el método homogéneo. En el método heterogéneo la quitina se trata con una disolución concentrada de hidróxido sódico a elevadas temperaturas con lo que se obtiene un residuo insoluble que es el quitosano con un grado de desacetilación del 85%-99%. En el método homogéneo se mezclan 30 gramos de NaOH con 45 de agua y 3 de quitina durante 3 horas a 25 °C para después bajar la temperatura a 0 °C, en este caso se obtiene quitosano con un grado de desacetilación del 48%-55%. Debido a que la solubilidad del quitosano se ve afectada por el grado de desacetilación del mismo y la posición en la que se produce esta desacetilación, el método heterogéneo da lugar a quitosano con distintas propiedades (Synowiecki and Al-Khateeb 2003).

- **Desacetilización enzimática**

La desacetilación química tiene sus desventajas como es el consumo de la energía o el gasto de solución alcalina que se traduce en la contaminación ambiental, además de la obtención de productos muy heterogéneos.

Para solucionar los problemas derivados de la desacetilación química, se ha investigado un proceso más controlado y específico como es la desacetilación enzimática empleando desacetilasas, con el que se puede llegar a obtener un quitosano mucho más definido. Las desacetilasas empleadas son de origen fúngico y su máxima actividad se da a una temperatura de 50 °C. En el caso de las producidas por *C. lindemuthianum* y *A. nidulans* las enzimas no son inhibidas por acetato, uno de los productos de reacción, lo que las hace idóneas para la aplicación biotecnológica (Yong Zhao et al. 2010).



Uno de los puntos clave en la obtención del quitosano, al igual que en el caso de la quitina, es la eliminación de proteínas extraídas con los polisacáridos ya que pueden afectar a las propiedades del quitosano y a su empleo.

Las propiedades físico químicas del quitosano se pueden ver afectadas, además de por el peso molecular y por el grado de desacetilación, que no es el mismo en todos los casos. Por la distribución de cargas (lugar en el que se produce la desacetilación) y por la modificación química. Aunque el grado de solubilidad del quitosano también se ve afectado por las características del mismo, suele ser una sustancia muy insoluble en agua (Hosseinnejad and Jafari 2016).

El quitosano es una estructura biocompatible, que ha demostrado ser una sustancia no tóxica y biodegradable. La biodegradación se produce por enzimas humanas tales como la lisozima o tres quitinasas humanas, quitinasa ácida de mamífero (AMCasa), di-N-acetilquitobiasa y la quitotriosidasa. Estas enzimas están presentes tanto en el tracto intestinal como en el hígado y en el plasma.

El empleo del quitosano se extiende a numerosos campos, desde su uso en agricultura como antifúngico, en producción industrial de fibras y *films* para la conserva de alimentos, el cuidado dental y la producción de cosméticos o la producción de baterías sólidas (Srinivasa and Tharanathan 2007). Aunque es quizá, la medicina, uno de los campos en los que las propiedades del quitosano pueden tener vital importancia.

Algunas de las propiedades responsables de dicha importancia son 1) es moldeable con una gran facilidad para formar estructuras porosas, 2) tiene actividad antibacteriana intrínseca lo que disminuye las posibilidades de que se produzca una infección, 3) se puede combinar fácilmente con una gran cantidad de polímeros como el alginato, el ácido hialurónico,.. aprovechando las características de los distintos polímeros (Di Martino, Sittinger, and Risbud 2005).

Es por esto que el quitosano ha sido empleado como biomaterial en medicina regenerativa para la regeneración de piel, huesos y cartílago, además de otros tejidos (Shi et al. 2006), y, actualmente, en sistemas de liberación controlada de fármaco, tanto en forma de micro como de nanopartículas (Agnihotri et al. 2004).

### 3.1.2 Polímeros de naturaleza proteica

#### a. Colágeno

El colágeno es un biomaterial que se puede aislar de numerosos tejidos biológicos como son la piel, los tendones, los huesos,... Aunque existen diversos tipos de colágeno (28 formas diferentes), es el colágeno de tipo I el más abundante. Se trata de una estructura muy conservada entre diferentes especies lo que facilita su obtención y posterior empleo en el ser humano sin desencadenar una respuesta inmune. Además presenta zonas de unión a las células.

En función del pH y la temperatura, el colágeno puede formar fibras o hidrogeles en tres dimensiones, son estas estructuras de tres dimensiones las que más se han empleado en la formación de *scaffolds*.

Los biomateriales basados en colágeno se han empleado en la reparación de daños nerviosos del sistema nervioso periférico, además de haberse observado su función como promotores del crecimiento axonal en el sistema nervioso central (Khaing & Schmidt 2012).

#### b. Ácido hialurónico

Este compuesto proteico es otro componente de la matriz extracelular de mamíferos. Como los otros materiales tratados se trata de un compuesto biocompatible cuyas propiedades pueden ser modificadas para que se adapte a las necesidades del organismo (Agrahari and Youan 2012).

Los principales usos del ácido hialurónico como biomaterial son: cultivos celulares en tres dimensiones, transportadores de fármacos y producción de *scaffolds* en implantes tras daños en los sistemas nerviosos central y periférico humanos.

#### c. Albúmina

La albúmina es la proteína más abundante en el plasma sanguíneo, llegando a significar el 50% del total de las proteínas en él. Se trata de una proteína relativamente pequeña ya que está formada por una única cadena peptídica de 585 aminoácidos con un peso molecular de 66.500 Da. Estructuralmente está formada principalmente por hélices  $\alpha$  unidas por puentes disulfuro (Sugio et al. 1999). En esta estructura abundan

los residuos de lisina, arginina, glutamato y aspartato, también abundan los de metionina y triptófano (figura 13).

La síntesis de la albúmina se produce exclusivamente en hígado. La albúmina es producida en el retículo endoplásmico rugoso de los hepatocitos para después ser vertida al torrente sanguíneo. Es extravasada al compartimento intersticial por transporte pasivo en parte por defenestraciones en los capilares (Rozga, et al. 2013)..

Esta proteína está implicada en diversas funciones. Es uno de los principales responsables en mantener la presión osmótica, gracias a su tamaño relativamente pequeño y a su gran concentración. Está implicada, además, en el equilibrio ácido-base del organismo, es capaz de ejercer de tampón tanto en condiciones de acidosis, gracias a sus residuos de histidina, como en condiciones de alcalosis, gracias a la posibilidad de ceder protones.

Es quizá su función transportadora una de las más interesantes. Tanto su estructura como los aminoácidos que la forman, confieren a la albúmina la capacidad de interaccionar de forma reversible con un gran número de sustancias:

- Iones metálicos.

Aunque la albúmina presenta lugares de unión específica para iones como el cadmio, el zinc o el manganeso también es capaz de unir otros iones como son el calcio, el hierro y el mercurio (Bal et al. 2013).

- Ácidos grasos

La albúmina, junto con las lipoproteínas, es la encargada del transporte de lípidos en fluidos extracelulares. Así, es la encargada del transporte de ácidos grasos no esterificados, facilitando su distribución por el organismo que de otra forma no sería posible debido a su estructura (Uzbekov 2012; Spector 1975).

- Hormonas

Esta proteína es capaz, además, de interaccionar con hormonas como el cortisol (Degand et al. 2015; Aljhni et al. 2012).

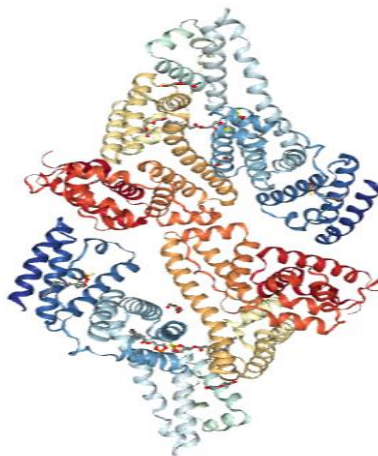
- Fármacos

La interacción de la albúmina con diversos fármacos ha hecho que sea un factor fundamental en la biodistribución de los mismos. La albúmina es capaz de transportar fármacos de naturaleza tanto hidrofílica como hidrofóbica. En el caso de los ácidos débiles, se unen casi exclusivamente a la albúmina mientras que las bases débiles son capaces de unirse a otros transportadores (Ghuman et al. 2005).

Esta unión es reversible, y va a afectar a cómo se distribuyen los fármacos llegando a reducir sus efectos adversos (Ghuman et al. 2005). La unión a fármacos puede estar influida a su vez por otras circunstancias, como la presencia de ácidos grasos unidos, ya que pueden actuar como moduladores alostéricos, como es el caso del ácido octanoico (Cheruvallath et al. 1996).

Aunque el uso de la albúmina para diversas enfermedades como la cirrosis ya se conocía (Caraceni et al. 2013), sus características han hecho que pueda ser empleado en otras aplicaciones como la ingeniería de tejidos. En este caso destacan la producción de scaffolds (Li et al. 2014) o los sistemas de liberación controlada.

Anteriormente se ha hecho mención al Abraxane®, sistema nanométrico de liberación controlada que une paclitaxel para el tratamiento de tumores sólidos como el de mama, pero existen otros sistemas de liberación de fármacos basados en la albúmina tanto mediante modificación de la albúmina o unidas a otros compuestos como pueden ser metales.



**Figura 13. Estructura tridimensional de la estructura de la proteína albúmina sérica humana. La estructura cristalina de la proteína se obtuvo de Proteína Data Bank (ID code: 5ID7)**



A decorative pattern of interconnected circles and lines, resembling a molecular or network structure, is positioned on the right side of the slide. The circles are in shades of red, green, and grey, and the lines are thin and grey.

# OBJETIVOS



---

# Objetivos

## 1. OBJETIVOS

Una de las enfermedades que en las últimas décadas ha cobrado especial relevancia es el cáncer, debido a que es una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial, fundamentalmente en los países desarrollados. Para el tratamiento de esta patología se han desarrollado distintas líneas terapéuticas que han conseguido mejorar la calidad de vida y disminuir la mortalidad de los pacientes, dentro de las cuales destaca la quimioterapia, sin embargo la administración sistémica de estos fármacos y la falta de selectividad por las células tumorales, conlleva la aparición de numerosos efectos secundarios que suponen en muchos casos la necesidad de abandonar el tratamiento. Esta es una clara limitación de los tratamientos convencionales con antineoplásicos, que hace necesaria la investigación para el desarrollo de tratamientos efectivos.

Una alternativa al tratamiento convencional es la utilización de nanomedicinas, es decir de sistemas que liberen el fármaco en el interior de las células tumorales y de esta forma eviten los efectos secundarios no deseados. Dentro de la nanomedicinas tienen una gran importancia las nanopartículas ya que estos sistemas permiten la vehiculización de antineoplásicos hacia las células tumorales aprovechando las características especiales de las mismas (vehiculización pasiva) o dirigiéndolas específicamente hacia ese tipo celular mediante el uso de marcadores de superficie que estén sobre-expresados en dichas células (vehiculización activa).

Por todo lo anteriormente expuesto el Objetivo General consiste en el desarrollo de sistemas nanométricos de liberación controlada basados en polímeros naturales (quitosano/albúmina) con la finalidad de encapsular el fármaco quimioterapéutico doxorubicina, evitando así su degradación y haciendo que alcance de una forma más efectiva sus dianas de acción, las células tumorales.

Para llevar a cabo dicho Objetivo General se proponen los siguientes objetivos secundarios:

- Síntesis y caracterización químico-física de nanosistemas basados en la combinación polisacárido/proteína, concretamente quitosano/albúmina.



- Vectorización con folato de los sistemas obtenidos mediante la unión de ácido fólico. Caracterización de los sistemas nanoparticulados vectorizados con el ligando.
- Encapsulación en los nanosistemas del antineoplásico, doxorrubicina, para generar un nanofármaco. Evaluación de los nanofármacos como sistema de liberación controlada: cuantificación del fármaco incluido y valoración de la cinética de liberación.
- Evaluación de los nanosistemas en cultivos celulares de líneas de cáncer de mama humano, MCF7 y T47D y de cáncer de ovario humano, HeLa, con el fin de determinar su internalización y su efectividad cuando vehiculizan la doxorrubicina.
- Análisis de la biocompatibilidad in vivo en modelo de rata. La inyección de las nanopartículas permitirá determinar su efecto en parámetros hematológicos, marcadores bioquímicos plasmáticos de daño hepático y renal, así como defensas antioxidantes en tejidos.

Con la consecución de estos objetivos se obtendrá información sobre la utilidad final de estas nanomedicinas y el desarrollo posterior de las mismas.

A decorative background on the right side of the page featuring a network of interconnected nodes and lines, resembling a molecular structure or a complex graph. The nodes are colored in shades of red, green, and grey, and the lines are thin and grey.

# MATERIALES Y MÉTODOS



# Materiales y métodos

## 1. SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS

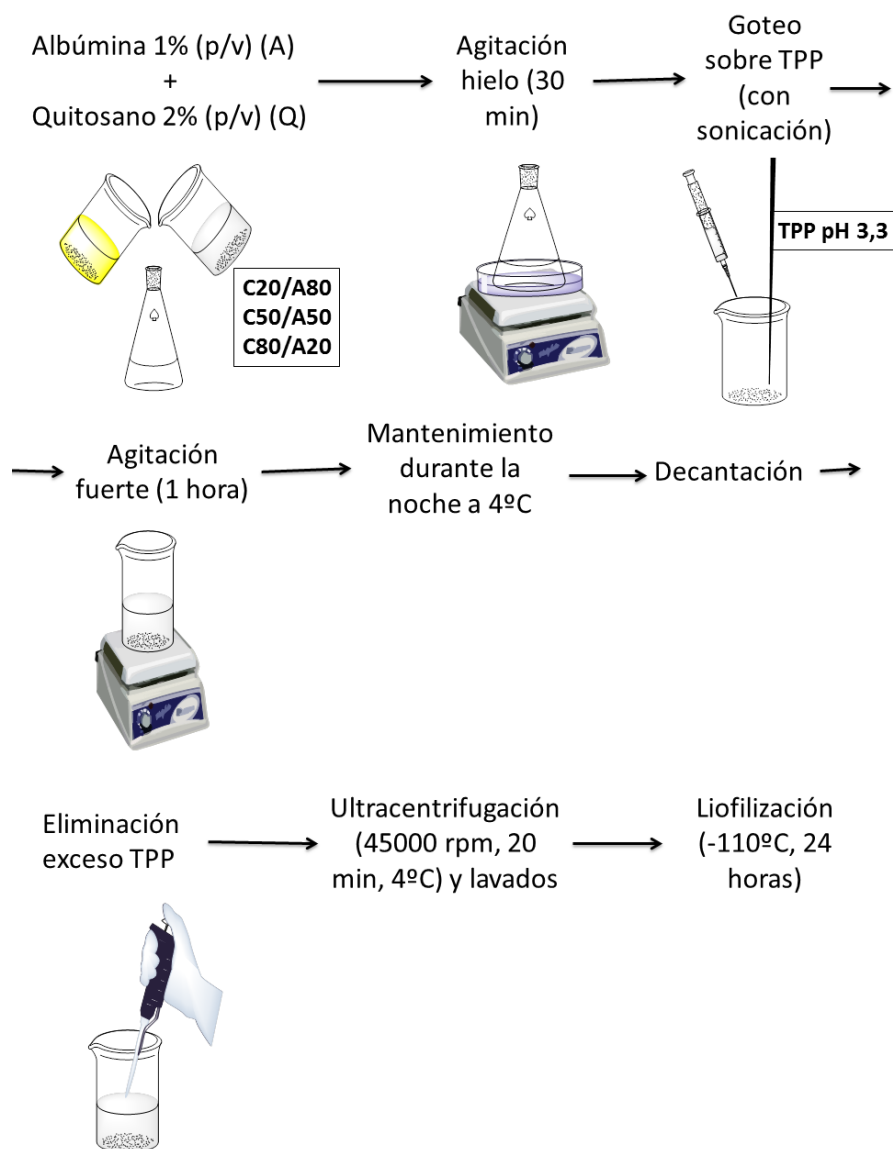
### 1.1 Síntesis de nanopartículas no funcionalizadas

Con el fin de obtener nanopartículas como sistemas de liberación controlada basados en una matriz de monómeros naturales, se eligieron como materiales el quitosano (C) (dilución 1 % p/v en ácido acético al 0,5 M) y la albúmina de suero bovino (A) (dilución 2 % p/v en ácido acético 0,5 M), a partir de los cuales se sintetizaron tres sistemas distintos de nanopartículas variando la proporción en volumen de dichos compuestos: C20/A80 (con 20 % de quitosano y 80% de BSA), C50/A50 (con 50% de BSA y 50% de quitosano) y C80/A20 (con 80 % de quitosano y 20% de BSA).

La síntesis se realizó mediante entrecruzamiento iónico aprovechando las características de los materiales, ya que a pH 3,3 tanto la albúmina como el quitosano presentan grupos protonados. Para permitir la interacción entre el quitosano y la albúmina se empleó tripolifosfato sódico (TPP) como entrecruzante.

Las disoluciones de quitosano y albúmina en ácido acético se mezclaron en las proporciones correspondientes según las composiciones de las nanopartículas y la mezcla se mantuvo en agitación durante 30 minutos en un baño de hielo. Dicha mezcla se goteó de 5 mL en 5 mL sobre 100 mL de la disolución de TPP (1% pH 3,3) bajo sonicación (Bransonsonifier 450) empleando un baño de hielo para mantener la temperatura.

Una vez mezclados los compuestos con el entrecruzante, la solución se mantuvo durante una hora en agitación continua (100 rpm) a temperatura ambiente y durante la noche a 4 °C para obtener una suspensión. La suspensión resultante se ultracentrifugó (45.000 rpm, 20 min, 4 °C, BeckmanCoulter Optima L-100 XP Ultracentrifuge). Tras realizar dos lavados, el pellet se liofilizó durante 24 h a -110 °C (HetoPowerDry LL1500 FreezeDryer, Thermo Electro Corporation). El producto de la liofilización se conservó a 4 °C hasta su uso. El método de síntesis se detalla en la figura 14.



**Figura 14. Esquema del procedimiento de síntesis de las nanopartículas**

## 1.2 Síntesis de las nanopartículas funcionalizadas con ácido fólico

Con la finalidad de mejorar el tratamiento y hacer que sea más específico para el tumor sin que llegue a dañar a los tejidos normales, es conveniente modificar las nanopartículas con ligandos que propicien la vehiculización activa.

La vehiculización se ha llevado a cabo con el ácido fólico, ya que sus receptores están sobreexpresados en una gran variedad de tejidos tumorales humano, pero no está sobreexpresado en el tejido no tumoral. Además, el ácido fólico muestra una alta afinidad por los receptores de folato ( $K_d = 0,1 \text{ nM}$ ) lo que le hace una molécula idónea para la vectorización

de las nanopartículas y que estas sean incluidas en las células tumorales por endocitosis (Du et al. 2016).

El ácido fólico es una molécula capaz de unirse a otras moléculas mediante la formación de un enlace amida tras la activación de sus grupos amino, en presencia de una carbodihimida. Por ello, la vectorización de las nanopartículas se realizó mediante un proceso que consta de dos pasos diferenciados que se basan en: 1) activación del ácido fólico y 2) unión del ácido fólico a las tres composiciones diferentes de las nanopartículas.

### **1.2.1 Activación del ácido fólico**

La activación del ácido fólico se basa en la formación del éster N-hidroxisuccinimida de ácido fólico (NHS-fólico) de acuerdo con el método de Lee y Low (Lee and Low 1994). Para ello, se disolvieron 2,5 g de ácido fólico en 50 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) y 1,25 mL de trietilamina (TEA). Esta mezcla se hizo reaccionar con 1,3 g de N-hidroxisuccinimida (NHS) y 2,35 g de diciclohexilcarbodiimida (DCC) y se mantuvo en agitación durante la noche a temperatura ambiente. Posteriormente se filtró a vacío para eliminar el producto secundario formado, la diciclohexilurea, y se liofilizó durante 24 h a -110 °C (HetoPowerDry LL1500 FreezeDryer, Thermo Electro Corporation). El producto obtenido se lavó con dietiléter anhidro hasta la precipitación de unos cristales amarillos, que corresponderían al NHS-folato, que se secaron en la estufa a vacío, para su posterior uso.

### **1.2.2 Unión del NHS-folato a las nanopartículas**

La conjugación del ácido fólico activado con las nanopartículas se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Zhang y col. (Zhang et al. 2004). Para ello se preparó una suspensión de nanopartículas en agua Mili-Q a una concentración 10 mg de NP/mL ajustando el pH a 10 utilizando tampón bicarbonato 1M. A esta suspensión en agitación se le añadió por goteo 1 mL de DMSO en el que se habían disuelto 50 mg del NHS-folato obtenido previamente. La mezcla se mantuvo a temperatura ambiente en agitación durante 45 minutos alejada de la luz, posteriormente se centrifugó (41.000 rpm, 20 min) y lavó con DMSO para eliminar los restos del ácido fólico que no se han unido y otros productos de la reacción. Como paso final se liofilizaron las nanopartículas en un liofilizador a -110 °C durante 24 horas y se conservaron en un ambiente seco a temperatura ambiente hasta su posterior utilización.

### 1.2.3 Cuantificación del ácido fólico unido a las nanopartículas

La cuantificación del ácido fólico unido a las nanopartículas se realizó mediante un estudio espectrofotométrico. Para ello, se preparó 1 mg de nanopartículas funcionalizadas con ácido fólico. Después se añadió 1 mL de agua mili-Q y 200  $\mu$ L de ácido clorhídrico en agitación.

A valores de pH inferiores a 1 las nanopartículas se desestabilizan y se disgregan, con lo que la adición del ácido clorhídrico favoreció la disgregación de los nanosistemas y la liberación del ácido fólico unido. El ácido fólico liberado de las partículas se cuantificó midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 318 nm (Evolution 201, ThermoScientific, España).

## 2. ESTUDIOS DE HINCHAMIENTO

Con el fin de obtener una mejor eficiencia de incorporación del fármaco se realizaron estudios de hinchamiento de las nanopartículas, en los que se probaron diferentes medios donde la doxorubicina es soluble.

El comportamiento de las nanopartículas se evaluó en un medio alcohólico (etanol), tampón fosfato salino (PBS, pH = 7,4 y pH = 5,0) y agua. Para ello se pesaron 5 mg de cada formulación de nanopartículas y se incorporaron a ambos medios, manteniéndose durante 24 horas a temperatura constante (37 °C). Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas (5.000 rpm, 5 min) y se eliminó el sobrenadante. Las nanopartículas obtenidas al retirar el sobrenadante se pesaron y el índice de hinchamiento se obtuvo mediante la fórmula (Kim et al. 2003):

$$\text{Índice de hinchamiento (\%)} = \frac{W_S - W_D}{W_D} \times 100$$

Donde:  $W_S$  corresponde al peso de las nanopartículas tras el hinchamiento y  $W_D$  corresponde al peso inicial de las nanopartículas.

### 3. INCORPORACIÓN DEL FÁRMACO DOXORRUBICINA (DOX) EN LAS NANOPARTÍCULAS

El fármaco empleado incluido en los nanosistemas fue el antineoplásico doxorubicina (DOX), de la familia de las antraciclinas. La DOX se encapsuló mediante la inmersión de 20 mg de nanopartículas en 2 mL de una solución acuosa de DOX (150 µg/mL) a temperatura ambiente (22 °C) en oscuridad mediante agitación orbital constante (Labinco, 50 rpm) durante 17 h. Tras ello, el medio se basificó hasta pH 7,5-8 mediante la adición de 2 µL de trietilamina (TEA) y la suspensión fue mantenida mediante agitación orbital constante durante 24 horas a temperatura ambiente (22 °C) en oscuridad. La suspensión fue centrifugada a 5.000 rpm durante 5 minutos (Digicen 20-R OrtoalresaCentrifuge, Radius8.2 cm rotor; Madrid, España) y el sedimento obtenido se liofilizó a -110 °C durante 24 horas. El producto se conservó en atmósfera seca hasta su posterior utilización.

#### 3.1 Determinación de la eficiencia de incorporación de la doxorubicina en las nanopartículas

La eficiencia de incorporación se define como la relación entre el fármaco real encapsulado y el fármaco teórico que se podría incorporar a las nanopartículas.

Para determinar el contenido de DOX en las nanopartículas, se midió la concentración de DOX en la disolución de carga tanto antes como después del proceso de carga. La cantidad de fármaco incorporado correspondería a la diferencia de concentración de DOX en ambos momentos. Las medidas de la concentración de DOX, se realizó mediante ensayos espectrofotométricos empleando un espectrofotómetro (Espectrofotómetro Evolution 201, Thermo Scientific) midiendo la absorbancia a 495 nm.

La eficiencia de encapsulación del fármaco (%) se calculó de acuerdo con la (Benoit et al., 1999):

$$\text{Eficiencia de incorporación (\%)} = \frac{\text{carga real de fármaco}}{\text{carga teórica de fármaco}} \times 100$$

Siendo la carga teórica la máxima concentración de doxorubicina que se puede incorporar en las nanopartículas, correspondiente a la concentración real de la doxorubicina que se pone en contacto con las nanopartículas.



## **4. CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS**

### **4.1 Caracterización del tamaño y la morfología**

El tamaño y la morfología de las partículas es un factor determinante en su uso como sistema de liberación de fármacos, ya que de ello va a depender tanto la efectividad, como la biocompatibilidad de las mismas. Así, una forma esférica produce un rozamiento menor y facilita el transporte de las partículas. Adicionalmente, un tamaño nanométrico favorecerá la vectorización pasiva de las nanopartículas, atravesando los poros de los vasos sanguíneos del tumor y acumulándose en su entorno, además de su inclusión al interior de las células tumorales por endocitosis.

El tamaño y la morfología de las nanopartículas fueron estudiados por microscopía electrónica de transmisión (TEM) en el ICTS Centro Nacional de Microscopía Electrónica de la Universidad Complutense de Madrid. Para ello, se empleó un Microscopio de Transmisión Electrónica (JOEL JCM 1010) con un voltaje de aceleración de 100 KV, un cañón de electrones termoiónico de B6La, y una resolución entre puntos de 0,35 nm. Todo ello acoplado a una cámara megaview II para captar las imágenes. Las nanopartículas se dispersaron en agua destilada a temperatura ambiente (22 °C), y se depositaron en un soporte de cobre con formvar y carbón de 200 mesh, adquiridos en TED PELLA, INC.

El tamaño de las partículas se calculó midiendo el diámetro en las imágenes obtenidas del microscopio y calculando el diámetro promedio en número.

### **4.2 Análisis termogravimétrico (TGA)**

Uno de los parámetros importantes en la caracterización de las nanopartículas es su estabilidad térmica, tanto de los nanosistemas como de sus monómeros constituyentes. Su determinación puede llevarse a cabo mediante la termogravimetría, la cual nos indica la variación de la masa producida en una muestra al ser sometida a un cambio de temperatura durante un periodo de tiempo determinado y con una atmósfera controlada. Además, nos permite determinar la composición de los materiales mediante el análisis de la pérdida o ganancia de masa indicativa de la descomposición de la muestra o de la interacción entre los componentes.

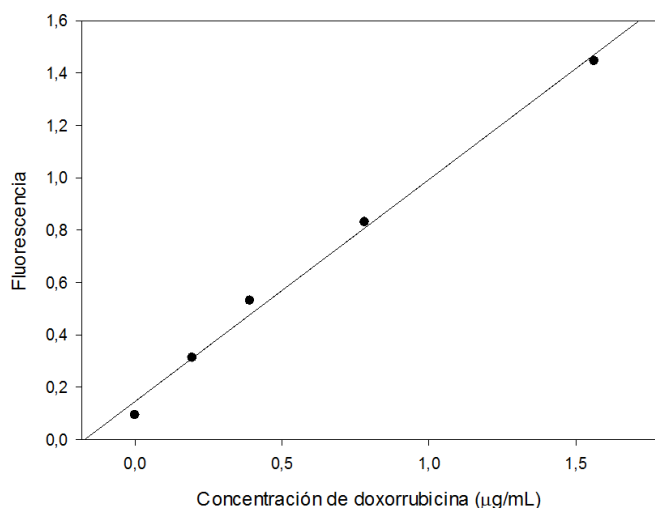
Por tanto, para la caracterización de las nanopartículas vectorizadas y sin vectorizar, con y sin fármaco, se llevó a cabo un estudio comparativo entre dichos nanosistemas, los monómeros constituyentes, el ácido fólico y la doxorubicina, mediante termogravimetría.

Las curvas termogravimétricas (TGA) y sus derivadas (DTG) se obtuvieron a partir de 2 mg de muestra, mediante el analizador termogravimétrico TGA/SDTA851°, (Mettler Toledo) usando crisoles de aluminio bajo una atmósfera de nitrógeno dinámica (flujo de nitrógeno 6 cc/min.), a una velocidad de 10 °C/min. En un intervalo de temperatura de 25 °C a 600 °C.

## **5. LIBERACIÓN DEL FÁRMACO INCORPORADO EN LAS NANOPARTÍCULAS**

La liberación del fármaco incorporado en las nanopartículas es un factor fundamental en su empleo como sistema de liberación controlada. De ello va a depender tanto su forma de administración como la cantidad de nanopartículas que va a ser necesario administrar. Es conocido que cuando el pH es inferior a 1 las nanopartículas se disgregan, y, por tanto, serán capaces de liberar todo el fármaco incorporado. Por ello, en este estudio se comprobó el comportamiento de las nanopartículas en un medio a pH fisiológico. Para ello, se pesaron 5 mg de nanopartículas con el fármaco incluido y se añadieron 15 mL de tampón fosfato (pH 7,4). Se mantuvo en agitación orbital constante, a una velocidad de 100 rpm y a 37 °C, utilizando el incubador Ecotron®Inforts AG CH-4103. A intervalos de tiempo desde el primer contacto de las nanopartículas con el medio, se recogieron muestras de 200 µL que se fueron reemplazando por la misma cantidad de tampón fosfato pH 7,4 previamente atemperado.

Las alícuotas recogidas se mantuvieron a -20 °C hasta la cuantificación de la concentración de DOX presente en la muestra. El fármaco se cuantificó por medida de fluorescencia (Varioskan, Thermo Fisher Scientific, Barcelona, España) usando una longitud de onda de excitación de 490 nm y una longitud de onda de emisión de 600 nm. Se utilizó una curva de calibrado empleando cantidades conocidas de DOX (0,39-12,5 µg/mL) en tampón fosfato pH 7,4 (figura 15).



**Figura 15. Recta de calibrado de la DOX**

El ensayo de liberación se realizó por triplicado, para cada una de las formulaciones de nanopartículas con fármaco. Para ello, se contemplaron las condiciones “*sink*”, lo que significa que el volumen del medio es de 5 a 10 veces mayor que el volumen requerido para obtener una solución saturada de un fármaco, o lo que es lo mismo, la concentración del fármaco en el medio de disolución tiene que ser menor del 10 % de la concentración de saturación. De este modo se asegura que la concentración del fármaco en el medio de liberación sea lo suficientemente pequeña como para conseguir la total liberación del mismo desde las partículas, sin que la disolución se sature, o que una elevada concentración afecte al proceso de liberación. Hay que tener en cuenta que la solubilidad de la DOX es de 50 mM, mucho mayor que la cantidad de doxorubicina incorporada en las nanopartículas; por tanto, estaremos siempre dentro de las condiciones “*sink*”.

## 6. ESTUDIOS EN CULTIVOS CELULARES

Tras la caracterización *in vitro* de los sistemas, se estudió su efectividad en células epiteliales cultivadas en monocapa, es decir, un cultivo de dos dimensiones. Son modelos celulares muy ventajosos, puesto que permiten la rápida determinación de la incorporación celular de los sistemas, la bioactividad del fármaco y la toxicidad del vehículo.

Los estudios en cultivos celulares se llevaron a cabo en condiciones de esterilidad utilizando una campana de flujo laminar vertical (Heraeus-Hera Safe), material plástico estéril (Sarstedt Ag & Co.) y material esterilizado en el autoclave SteamSterilizer TRADE Paypa a 121 °C durante 21 minutos.

Las líneas celulares que se utilizaron fueron:

- Células MCF7: línea celular proporcionada por el Dr. Cayetano Von Kébbe que corresponde a células obtenidas en 1973, a partir de un derrame pleural de carcinoma de mama humano obtenidas. Su utilidad se debe a que suponen un buen modelo in vitro para evaluar la eficacia de sustancias antitumorales. Es una línea celular que expresa receptores de estrógenos (Carr et al. 2016) y receptores de folato (Pi et al. 2013).
- Células HeLa: línea celular proporcionada por el Dr. Alberto Tiérrez. Se trata de una línea celular de cáncer de cérvix obtenida en 1951. Como ocurre con la línea celular MCF7, es positiva para la expresión de receptores de folato (Qiao et al. 2016), en cambio, no lo es para la expresión de receptores de estrógenos.
- Células T47D: proporcionadas por la Dra. Pérez-Castillo, es una línea celular de carcinoma de mama humano. Son positivas para la expresión de receptores de fólculo y de estrógenos.

## 6.1 Mantenimiento del cultivo celular

Las células se mantuvieron en el medio de cultivo Eagle, modificado por Dulbecco (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM) + GlutaMax-I (Gibco BRL). El medio se suplementó con un 10 % de suero fetal bovino (FBS) previamente descomplementado a 56 °C durante 30 minutos, para inactivar las proteínas de dicho suero. Para evitar contaminaciones, se añadieron penicilina (50 U/mL), estreptomicina (50 µg/mL) (Invitrogen Live Technologies) y gentamicina (50 µg/mL) (Sigma-Aldrich). Las células crecieron a una temperatura de 37 °C en un incubador, humidificado y con una atmósfera del 5 % de CO<sub>2</sub> (HERA cell, Sorvall Heraeus, Kendro Laboratory Prodcuts GmbH, Hanau, Alemania). Las células se sembraron en frascos de 75 cm<sup>2</sup> (Sarstedt Ag an Co., Barcelona, España). La densidad celular alcanzada a lo largo del tiempo, se controló mediante microscopio invertido de contraste de fases (Zeiss), así como por cambio de color del medio. El medio de cultivo tiende a acidificarse cuando se alcanza una densidad

celular elevada y esto se detecta mediante el indicador de pH, rojo fenol presente en el medio, que torna de color rojo a naranja-amarillento.

## 6.2 Subcultivo

La mayoría de líneas celulares, si mantienen las condiciones de crecimiento adecuadas, son capaces de, en aproximadamente 2 días, doblar su población. El hecho de tratarse de un cultivo en monocapa, al alcanzar la confluencia en pocos días, hace necesario realizar subcultivos cuando el crecimiento celular alcanza una confluencia del 90-95 %. De esta manera, se impide la inhibición de crecimiento por contacto así como se evita el empobrecimiento del medio al disminuir los nutrientes y aumentar la concentración de productos de desecho, consecuencias ambas del crecimiento celular.

Para realizar el subcultivo, la monocapa celular se disgregaba mediante tripsinización (tripsina, 0,05 %) (Invitrogen Live Technologies), gracias a la acción de la proteasa sobre las uniones de las células a la superficie de la placa. Previamente a la tripsinización se realizan sucesivos lavados con tampón fosfato salino (PBS) (Sigma-Aldrich) autoclavado para eliminar los restos de suero que puedan inhibir la acción de la tripsina. Para que se produzca la digestión con tripsina, las células se incubaron con esta durante 5 minutos a 37 °C. Posteriormente se inactivó la tripsina con suero fetal bovino (FBS) y la suspensión celular se centrifugó a 1.000 rpm durante 5 minutos (centrifuga Digiten 20.R). El sedimento se resuspendió en 1 mL de medio DMEM al 10 % en FBS y se diluyó en un nuevo frasco de 75 cm<sup>2</sup>.

## 6.3 Conservación del cultivo celular

Durante el tiempo en el que las líneas celulares no se mantenían en condiciones experimentales, estas se congelaron en nitrógeno líquido o a una temperatura de -80 °C (para periodos cortos). El proceso de congelación es un proceso gradual en el que tiene que existir un agente crioprotector, por ejemplo el dimetilsulfóxido (DMSO), el cual es el que se empleó en este caso. La congelación se realizó cuando las células alcanzaban un 100 % de confluencia, empleando FBS como medio de congelación (10% v/v de DMSO).

La descongelación celular es un proceso rápido en el que las células pasan directamente de la temperatura de congelación a 37 °C. Las células descongeladas se sembraban en frascos de 75 cm<sup>2</sup> (mismo frasco del que se partió en la congelación) en medio

de cultivo DMEM con los suplementos antes indicados, durante 24 horas. Tras la adhesión de las células a la superficie del frasco, el medio se cambió con el objeto de eliminar el DMSO presente, debido a su toxicidad.

#### 6.4 Estudios de viabilidad celular

Cuando se utilizan biomateriales para formular sistemas de liberación controlada, es crucial evaluar la citocompatibilidad. En caso de que se demuestre la citocompatibilidad, se podría minimizar la toxicidad y los efectos adversos que pueden provocar por la administración de los biomateriales y, por tanto, podrían ser utilizados en pacientes (A. Jain et al. 2015). La citocompatibilidad se puede medir de forma indirecta, valorando la viabilidad celular después de la exposición celular al biomaterial durante un periodo de tiempo determinado.

La viabilidad celular fue evaluada indirectamente mediante el método colorimétrico de metiltiazoltetrazolium (MTT) basado en el proceso descrito por Mosmann (Mosmann 1983). Este estudio tiene su fundamento en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa, que genera un compuesto de color morado/azul (formazán). La absorbancia de este producto es máxima a 570 nm y su medida permite determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas. La viabilidad celular está condicionada por esta funcionalidad mitocondrial, por lo que la medida de este compuesto está relacionada con la viabilidad celular siendo directamente proporcional al número de células vivas. El reactivo inicial es soluble en agua y, por tanto, en el medio de cultivo. Cuando se forman los cristales morados de formazán, estos se disuelven en un disolvente orgánico como es el DMSO, dando una coloración más o menos intensa en función de la cantidad de formazán. La concentración de dicho compuesto se midió a una absorbancia de 570 nm empleando un lector de microplacas (Varioskan, Thermo Fisher Scientific, Barcelona, España).

El valor máximo de viabilidad (100 %) se atribuyó a las células a las que no se había tratado con nanopartículas, empleándose como valor de referencia en los estudios.

Se realizaron dos estudios diferentes de viabilidad:

- Curva dosis respuesta.

Con este estudio se pretende conocer tanto la viabilidad de los cultivos a diferentes concentraciones de nanopartículas y de fármaco como la posible determinación del

índice  $IC_{50}$  de cada uno de los sistemas. Para ello se estudiaron diferentes concentraciones de doxorubicina (entre 0,01 y 100  $\mu\text{g/mL}$ ) y el equivalente en los sistemas de liberación controlada teniendo en cuenta la cantidad de fármaco incluido en los mismos (tablas 4 y 5). Las células se sembraron en placas de 96 pocillos, 2.500 células por pocillo en el caso de las Hela y 5.000 células por pocillo para las MCF7 y T47D. Las células se mantuvieron creciendo durante 24 horas en condiciones de 37 °C y 5% de  $\text{CO}_2$ . A las 24 horas se reemplazó el medio de cultivo por 100  $\mu\text{L}$  de medio DMEM con un 1 % de FBS y el fármaco, las nanopartículas con fármaco o las nanopartículas sin fármaco (nanopartículas blanco).

Las células se incubaron durante 24 horas con el tratamiento, tras lo cual se añadieron 50  $\mu\text{L}$  de MTT (1 mg/mL) diluido en medio DMEM con 1 % de FBS y se incubó en oscuridad a 37 °C 5% de  $\text{CO}_2$  durante 2 horas. Para diluir los cristales formados, se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de DMSO y se midió la absorbancia a 570 nm como se ha descrito anteriormente. A partir de estos datos se determinó el  $IC_{50}$  definido como la concentración de la droga a la que se produce el 50 % de la viabilidad celular (Barraud et al. 2005).

**Tabla 4. Relación entre la concentración de fármaco y las distintas composiciones de nanopartículas no funcionalizadas en función de la eficiencia de carga**

CONCENTRACIÓN DE DOX EN EL MEDIO DE CULTIVO CELULAR ( $\mu\text{g/mL}$ )	CONCENTRACIÓN DE NANOPARTÍCULAS CARGADAS CON DOX (mg/mL)		
	C20/A80-DOX	C50/A50-DOX	C80/A20-DOX
0,01	$19,23 \times 10^{-4}$	$9,34 \times 10^{-4}$	$12,19 \times 10^{-4}$
0,1	$19,23 \times 10^{-3}$	$9,34 \times 10^{-3}$	$12,19 \times 10^{-3}$
1	$19,23 \times 10^{-2}$	$9,34 \times 10^{-2}$	$12,19 \times 10^{-2}$
10	1,923	0,934	1,219
25	4,81	2,34	3,05
50	9,61	4,67	6,10
100	19,23	9,34	12,20

**Tabla 5. Relación entre la concentración de fármaco y las distintas composiciones de nanopartículas funcionalizadas en función de la eficiencia de carga**

CONCENTRACIÓN DE DOX EN EL MEDIO DE CULTIVO CELULAR ( $\mu\text{g/mL}$ )	CONCENTRACIÓN DE NANOPARTÍCULAS CARGADAS CON DOX ( $\text{mg/mL}$ )		
	C20/A80F-DOX	C50/A50F-DOX	C80/A20F-DOX
0,01	$1,44 \times 10^{-3}$	$8,26 \times 10^{-4}$	$9,70 \times 10^{-4}$
0,1	$1,44 \times 10^{-2}$	$8,26 \times 10^{-3}$	$9,70 \times 10^{-3}$
1	$1,44 \times 10^{-1}$	$8,26 \times 10^{-2}$	$9,70 \times 10^{-2}$
10	1,44	$8,26 \times 10^{-1}$	$9,70 \times 10^{-1}$
25	3,60	2,06	2,24
50	7,2	4,13	4,85
100	14,41	8,26	9,70

- Viabilidad a distintos tiempos

Para comparar el efecto del fármaco y de los sistemas tanto con fármaco incluido como sin él, se realizó un estudio con una concentración fija de DOX ( $1 \mu\text{g/mL}$ ) y los valores equivalentes de nanopartículas a distintos tiempos (1, 3 y 6 días). Las células se sembraron en placas de 96 pocillos a una concentración de 2.500 células/pocillo en el caso de las HeLa y de 5.000 células/pocillo en el caso de las MCF7 y de las T47D y se mantuvieron creciendo durante 24 horas en condiciones de  $37^\circ\text{C}$  y 5% de  $\text{CO}_2$ . A las 24 horas se reemplazó el medio del cultivo por  $100 \mu\text{L}$  de medio DMEM con un 1 % de FBS y el fármaco, las nanopartículas con fármaco y las nanopartículas sin fármaco (nanopartículas blanco). Las células se incubaron durante 1, 3 y 6 días en estas condiciones, y posteriormente se añadieron  $50 \mu\text{L}$  de MTT ( $1 \text{ mg/mL}$ ) diluido en medio con 1 % en FBS y se incubó en oscuridad a  $37^\circ\text{C}$  5% de  $\text{CO}_2$  durante 2 horas. Para diluir los cristales formados, se añadieron  $100 \mu\text{L}$  de DMSO y se midió la absorbancia a 570 nm como se ha descrito anteriormente. Los resultados se mostraron como el porcentaje de viabilidad celular en relación a la viabilidad de células control no tratadas.

## 6.5 Incorporación celular de las partículas (UPTAKE)

Este estudio se llevó a cabo con el fin de cuantificar y evaluar la inclusión de los sistemas funcionalizados y sin funcionalizar en el interior celular. Se evaluó mediante la medida de la fluorescencia emitida por un cromóforo (6-cumarina) incorporado en las partículas. La



incorporación del fluoróforo a las nanopartículas se realizó en un paso posterior a la síntesis descrita anteriormente. Para ello se preparó una disolución 0,5 mg/mL de cumarina en etanol absoluto en la que se eliminaron los cristales resultantes por precipitación. La cumarina se puso en contacto con las distintas composiciones de nanopartículas sin fármaco (50 mg de NP en 0,5 mL de la disolución de cumarina) y se dejó evaporar el etanol. La cumarina es 3-(2-Benzothiazolyl)-N,N-diethylumbelliferylamine, un colorante fluorescente.

Todas las condiciones experimentales se realizaron por quintuplicado y cada experimento por triplicado. Para este estudio se sembraron 10.000 células/pocillo en el caso de las líneas celulares MCF7 y T47D y 5.000 células/pocillo en el caso de las HeLa, en placas de 96. Tras 24 horas, se reemplazó el medio por 100  $\mu$ L de medio DMEM al 1 % de FBS con las nanopartículas, con y sin cumarina, a una concentración de nanopartículas equivalente a la de 1  $\mu$ g/mL de DOX en función de la carga de fármaco de cada composición de nanopartículas (tablas 4 y 5). Tras 2 horas de incubación a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub> en oscuridad, se retiró el tratamiento y se realizaron lavados con PBS para eliminar las nanopartículas que no se hubiesen incorporado en las células. Al finalizar los lavados se añadieron 100  $\mu$ L de buffer de lisis (PBS, SDS 2% y EDTA 50 mM), que rompe la membrana celular y permite la salida de las nanopartículas incorporadas, facilitando la cuantificación de la cumarina. Las partículas se cuantificaron valorando la fluorescencia a 488 nm usando un lector de microplacas (Varioskan, Thermo Fisher Scientific, Barcelona, España). La curva patrón se realizó en buffer de lisis con diferentes concentraciones de cumarina entre 5 ng/mL y 10  $\mu$ g/mL.

Además del estudio cuantitativo de la incorporación de las nanopartículas se realizó paralelamente un estudio cualitativo en el que tras los lavados con PBS se realizaron fotografías con una cámara acoplada a un microscopio con luz fluorescente (Leica DMIL, LeicaMicrosystems, Suiza).

### **6.6 Evaluación de la incorporación celular de las partículas mediante receptores de folato (UPTAKE)**

La incorporación celular de las partículas puede producirse mediante diversos mecanismos. Uno de ellos es gracias a los receptores de ácido fólico expresados en la membrana. Puesto que las partículas se vectorizaron con ácido fólico, se procedió a valorar y demostrar que la incorporación de estas partículas fue efectivamente a través del reconocimiento específico por estos receptores.

Este experimento se llevó a cabo de la misma manera que el anterior (incorporación celular) siguiendo el mismo protocolo con 6-cumarina, pero bloqueando previamente los receptores de fólico con ácido fólico libre antes de añadir las partículas funcionalizadas y sin funcionalizar. Para conseguir el bloqueo previo de estos receptores, 24 horas después de sembrar las células en la placa de 96 pocillos se cambió el medio por DMEM 1% FBS que tenía ácido fólico 1 mM y se dejó incubar durante 2 horas y 30 minutos. Durante este tiempo el ácido fólico se une a los receptores expresados en la membrana celular, bloqueándolos y saturándolos. A continuación se añadieron, las NP funcionalizadas y sin funcionalizar, a una concentración de 1mM. Se dejaron incubar durante 2 horas y 30 minutos, tiempo necesario para incorporar las partículas en el interior celular. Pasado dicho tiempo los pocillos se lavaron con PBS con la finalidad de eliminar todas aquellas partículas que no se hubieran incorporado en las células y posteriormente se añadieron 100 µL de buffer de lisis (PBS, SDS 2% y EDTA 50 mM). La cantidad de partículas incorporadas se cuantificó por fluorescencia a 488 nm usando un lector de microplacas (Varioskan, Thermo Fisher Scientific, Barcelona, España).

### 6.7 Especies reactivas de oxígeno en células

La inclusión de las nanopartículas en las distintas líneas celulares y, posteriormente en el organismo, puede conllevar la producción de especies reactivas de oxígeno. Para ver cómo afectan los distintos sistemas a la producción de estas especies reactivas de oxígeno se realizó un experimento basado en el paso de una forma reducida de una fluoresceína (diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína, H<sub>2</sub>DCFDA) a la especie 2',7'-diclorofluoresceína (DCF), por la oxidación en presencia de especies reactivas de oxígeno presentes en el interior celular.

Todas las condiciones experimentales se realizaron por quintuplicado y cada experimento por triplicado. Para este estudio se sembraron en placas de 96 pocillos a una concentración de 10.000 células/pocillo en el caso de las líneas celulares MCF7 y T47D y 5.000 células/pocillo en el caso de las HeLa. Tras 24 horas, se reemplazó el medio por 100 µL de medio DMEM al 1 % de FBS con el reactivo H<sub>2</sub>DCFDA a una concentración, tras dos horas de incubación, se reemplazó el medio por 100 µL de medio DMEM al 1 % de FBS con las nanopartículas a una concentración equivalente a 1 µg/mL de DOX. Tras 1 hora de incubación a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub> en oscuridad, se retiró el medio de cultivo y se realizaron lavados con PBS para eliminar las nanopartículas que no se hubiesen incorporado en las células. Al finalizar los lavados se cuantificaron las especies reactivas de oxígeno midiendo fluorescencia a 488 nm usando un lector de microplacas (Varioskan, THERMO Fisher Scientific, Barcelona, España).

## 6.8 Defensas antioxidantes en células

La administración de un fármaco o de los nanosistemas puede desencadenar una respuesta que conlleve un aumento del nivel de los radicales libres de oxígeno (ROS) mediante la generación de radicales libres como el hidroxilo, el ácido nítrico y el anión superóxido, así como la producción de sustancias, como el peróxido de hidrógeno, que pueden causar daño a moléculas, células o tejidos (Yang et al. 2016). Por esta razón se estudió la influencia que tenía la administración de los nanosistemas sin fármaco en la regulación del estrés oxidativo celular. Para ello se determinó la actividad de las principales enzimas antioxidantes: superóxido dismutasa, catalasa y glutatión reductasa. También se determinó una defensa antioxidante no enzimática como es el glutatión total.

Se llevó a cabo cada experimento por triplicado. Para ello, las células se sembraron en frascos de 25 cm<sup>2</sup> (Sarstedt Ag, Barcelona, España) hasta alcanzar una cantidad de 5.000.000 células/frasco. Tras el crecimiento, el medio se reemplazó por 7 mL de DMEM al 1 % de FBS que contenía las nanopartículas de composiciones: C20/A80, C50/A50 o C80/A20 y C20/A80F, C50/A50F y C80/A20F.

Tras 24 horas de incubación a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub>, se lavó cada frasco con 4 mL de PBS a 4 °C y 1 mL de Triton X-100 (1%, v/v) y se homogeneizó con una jeringuilla de 1 mL (BD Plastipak, Madrid, España) y con una aguja 25-G (BD Microlance, Irlanda para disgregar la membrana celular. Para poder realizar diferentes estudios, las muestras fueron alicuotadas y, parte de ellas guardadas a -80 °C para su posterior uso.

Tanto la SOD como la catalasa son enzimas con especial importancia en la primera línea de defensa antioxidante de los organismos frente al daño que puede producir el estrés oxidativo (Atli & Grosell 2016).

### 6.8.1 Cuantificación de la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD)

La enzima superóxidodismutasa (SOD) es una de las enzimas antioxidantes más importantes, cataliza la dismutación del anión superóxido en peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular (Sahib 2016). La actividad superóxido dismutasa se midió mediante el kit de ensayo comercial colorimétrico, OxiSelect Superoxide Dismutase Activity (CellBiolabs, Inc., San Diego, CA). Los

aniones superóxidos ( $O_2^-$ ) son generados por el sistema Xantina/Xantina Oxidasa (XOD) y se detectan gracias a una solución cromogénica (figura 16). Sin embargo, en presencia de SOD, la concentración de anión superóxido se reduce. En una placa de 96 pocillos, a 50  $\mu$ L de los lisados celulares obtenidos anteriormente, se añadieron 80  $\mu$ L de la mezcla que contiene la solución xantina, el cromógeno, el buffer de lisis y agua. Finalmente, se añadieron 10  $\mu$ L de la solución XOD 1X y se incubó durante 1 hora a 37 °C. La absorbancia se leyó a 490 nm mediante un lector de microplacas (Varioskan, ThermoFisherScientific, Barcelona, España). Los resultados se expresan como actividad de SOD por miligramo de proteína. La actividad de SOD se obtuvo mediante comparación con una recta patrón realizada previamente con un estándar de actividad enzimática de SOD. Cada muestra, incluidos los estándares se repitieron por triplicado.



**Figura 16.** Fundamento teórico de la medida de actividad enzimática de la superóxido dismutasa (SOD)

### 6.8.2 Cuantificación de la actividad de la enzima catalasa (CAT)

El peróxido de hidrógeno producido por la enzima superóxido dismutasa es eliminado gracias a la actividad de la catalasa. Esta enzima cataliza la reacción de reducción de esta molécula en agua y oxígeno (Atli & Grosell 2016). La actividad de la catalasa (CAT) se cuantificó mediante el método de Aebi (Aebi 1984). Para ello, se mezclaron 60  $\mu$ L de las muestras celulares con 1 mL de peróxido de hidrógeno al 3% (v/v) diluido en tampón fosfato (50 mM, pH 7) y se agitó la mezcla antes de realizar la medida. La cantidad de peróxido de hidrógeno que se descompone en presencia de la catalasa se midió mediante cambios en la absorbancia a 240 nm durante 60 segundos empleando un espectrofotómetro (Evolution 201, ThermoScientific, España). Los resultados se expresaron como actividad de catalasa por miligramo de proteína. Los valores de actividad de catalasa se obtuvieron a partir de una recta patrón de catalasa medida previamente. Cada muestra, incluyendo el estándar, se midió por triplicado.

### 6.8.3 Cuantificación del glutatión total (GSSG/GSH)

El glutatión (GSH) es un tripéptido que contiene cuya estructura presenta un enlace peptídico entre el grupo amino de la cisteína y el grupo carboxilo terminal de la cadena lateral de glutamato. La función de este tripéptido es la de proteger a las células de radicales libres producidos como consecuencia del estrés oxidativo. El contenido total de glutatión (GSSG/GSH) se midió empleando otro kit comercial colorimétrico, OxiSelect Total Glutathione (GSSG/GSH; CellBiolabs, Inc., San Diego, CA). Este kit se basa en la actividad reductora de la enzima glutatión reductasa sobre el glutatión oxidado (GSSG) para convertirlo en glutatión reducido (GSH) (figura 17). Para que esta reacción sea posible es necesaria la presencia de NADPH. El cromógeno que contiene el kit reacciona con el grupo tiol del GSH produciendo un compuesto coloreado. Se mezclaron 25  $\mu\text{L}$  de glutatión reductasa 1x con 25  $\mu\text{L}$  de NADPH 1x en pocillos de una placa de 96 pocillos, tras esto se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de los homogeneizados celulares. Finalmente, se añadieron 50  $\mu\text{L}$  de cromógeno 1X y se agitó para favorecer la reacción. El producto coloreado obtenido en la reacción se cuantificó midiendo su absorbancia a 405 nm mediante un lector de microplacas (Varioskan, Thermo Fisher Scientific, Barcelona, España) a intervalos de 2 minutos durante 10 minutos. El contenido total de glutatión se determinó por comparación del glutatión total medido en una curva estándar previa. Cada muestra, incluido el estándar, se midió por triplicado.

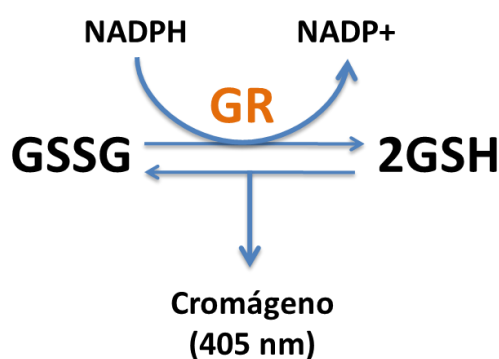


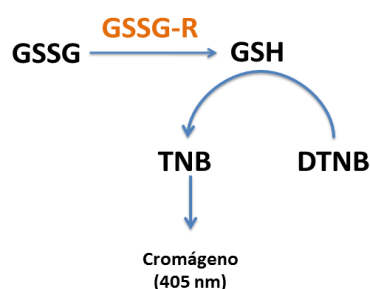
Figura 17. Fundamento teórico de la medida glutatión total

#### 6.8.4 Cuantificación de la actividad de la enzima glutatión reductasa (GSSG- R)

La glutatión reductasa (GSSG-R) es la enzima encargada de la reducción del glutatión oxidado en su paso a glutatión reducido. Esta enzima fue medida empleando un kit colorimétrico comercial, Glutathione Reductase Assay Kit (Abnova Corp.). Este kit se basa en la reducción de GSSG a GSH por la enzima GSSG-R, el glutatión reducido (GSH) reacciona con el ácido 5, 5'-ditiobis (2-nitrobenzoico) (DTNB) para generar un producto amarillo, el TNB, que presenta un máximo de absorción a una longitud de onda de 405 nm (figura 18). Para cuantificar el glutatión reducido producido únicamente por la acción de la enzima, es necesario tratar previamente la muestra con peróxido de hidrógeno para eliminar el glutatión reducido presente en la misma. Por ello, se trataron 100µL de muestra con 5 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% e incubar a 25 °C durante 5 minutos. Las muestras pretratadas y el control positivo se mezclaron con el buffer de ensayo hasta un volumen final de 50 µL. A esta mezcla de las muestras con el buffer de ensayo se le añadieron 50 µL de la mezcla de reacción que contiene buffer de ensayo, una solución de DTNB, una solución de NADPH y glutatión reducido como sustrato. Se midió la absorbancia de las muestras y de la curva estándar del producto TNB a 405 nm mediante un lector de microplacas (Varioskan, ThermoFisherScientific, Barcelona, España) a diferentes tiempos (T1, T2). La actividad de la glutatión reductasa fue calculada empleando la fórmula:

$$\text{Actividad GSSG - R} = \frac{\text{cantidad de TNB} \times \text{Factor de dilución de la muestra}}{(T2 - T1) \times 0.9 \times V}$$

Donde V es el volumen de muestra pretratada con peróxido de hidrógeno añadido a cada pocillo (en mililitros) y 0,9 es el factor de cambio de volumen debido al pretratamiento de la muestra.



**Figura 18. Fundamento teórico de la medida de la actividad de la glutatión reductasa**

## 7. ESTUDIOS DE BIOCOMPATIBILIDAD

### 7.1 Modelo animal y tratamiento con nanopartículas

Para estudiar los posibles efectos secundarios que producen las nanopartículas en un modelo in vivo, se utilizaron ratas albinas hembra Wistar con un peso de  $200 \pm 15$  g obtenidas de Harlan Inc. (Indianapolis, IN, USA). Todos los animales fueron mantenidos bajo un ciclo constante 12 horas de luz/ 12 horas de oscuridad a una temperatura de  $25 \pm 2$  °C y con una alimentación estándar y agua ad libitum. Todos los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con el Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad Complutense de Madrid.

Los estudios de biocompatibilidad se realizaron con los tres sistemas diferentes de nanopartículas sin fármaco y sin funcionalizar. Para ello, las ratas fueron divididas en cuatro grupos, cada uno de los cuales tenía cuatro animales ( $n=4$ ) y cada grupo se trató como se indica a continuación:

- Grupo I: tratados con solución salina (NaCl 0,9 % w/v)
- Grupo II: tratados con nanopartículas de composición C20/A80
- Grupo III: tratados con nanopartículas de composición C50/A50
- Grupo IV: tratados con nanopartículas de composición C80/A20

El peso de los animales fue registrado periódicamente empleando un granatario Mettler K-5.

Todos los experimentos se realizaron con los animales previamente anestesiados con isoflurano (IsoFlo, Esteve®, España)

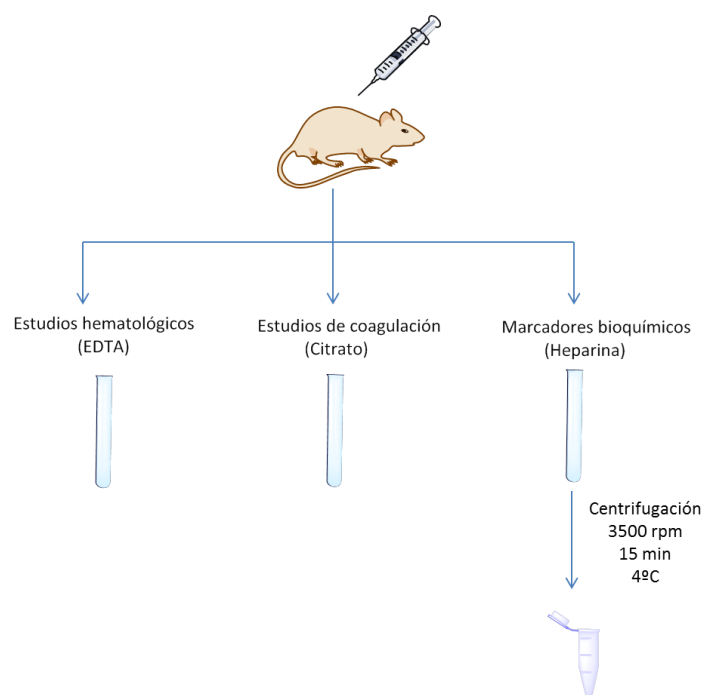
Los tratamientos fueron administrados por inyección en la vena de la cola con una única dosis de 20 mg/kg de peso rata diluidas en 500  $\mu$ L de suero salino (NaCl 0,9 % w/v) mediante una jeringuilla de 1 mL (BD Plastipak, Madrid, España) con una aguja de 25-G (BD Microlance, Irlanda).

Previamente a la administración de las nanopartículas y con el fin de evitar la formación de agregados que pudiesen afectar a la administración de las mismas, la suspensión se dispersó mediante sonicación en un baño de ultrasonidos (Elmasonic SH250EL) durante 5 minutos.

Durante el tiempo de duración del experimento (30 días) se fueron recogiendo muestras sanguíneas. Al finalizar el tiempo de tratamiento, los animales fueron sacrificados en cámara de CO<sub>2</sub> y se recogieron y pesaron sus órganos para siguientes medidas. Parte de los órganos se fijaron en paraformaldehído al 4 % para el ensayo histopatológico.

## 7.2 Muestras sanguíneas

Con el fin de evaluar el estado de los animales tras la administración de las nanopartículas, se recogieron muestras sanguíneas a diferentes tiempos previa y posteriormente al tratamiento con los nanosistemas. Las muestras sanguíneas fueron obtenidas mediante punción de la vena yugular, extrayendo 1 mL de sangre en cada punción. Para recoger las muestras se emplearon tres diferentes tipos de tubos divididos en función de los parámetros que se fuesen a medir, estos tubos diferían en el agente anticoagulante necesario para el análisis. Las muestras que se emplearon para estudios hematológicos fueron recogidas en tubos con ácido dietiltetraminoacético (EDTA) (12,5 µL/tubo; Aquisel, España). Las muestras necesarias para los estudios de coagulación se recogieron en tubos con citrato (94 µL/tubo; Deltalab, España) y las muestras necesarias para estudios de marcadores bioquímicos se recogieron en tubos que contenían heparina (15 µL/tubo; Dismadel, España) (figura 19).



**Figura 19. Esquema del procesamiento de las muestras sanguíneas**



### 7.3 Estudios hematológicos

Al tratarse de una administración intravenosa, la modificación de los parámetros hematológicos, tales como la cantidad de glóbulos blancos y glóbulos rojos, puede ser una señal de cómo afectan las nanopartículas al organismo. Para comprobar la forma en que se veían afectados los distintos parámetros hematológicos por la administración de los sistemas, se realizó un conteo de células tanto de la línea roja como de la línea blanca, se cuantificaron las plaquetas, el hematocrito, la hemoglobina y el volumen corpuscular medio mediante un contador automatizado (KX-21N Sysmex, Madrid, España) a tres diferentes tiempos (0, 9 y 30 días después de la administración de las nanopartículas). En todos los casos las medidas se realizaron a partir de la fracción de sangre completa, como se ha explicado en apartados anteriores.

### 7.4 Estudios de coagulación

Para evaluar la posible influencia de las nanopartículas en la cascada de la coagulación se estudiaron diversos parámetros relacionados con ella como son el tiempo de protrombina (PT), el fibrinógeno (Fbg) y la antitrombina III (ATIII). Para ello se extrajo sangre a diferentes tiempos pre y post administración de las nanopartículas (0, 1, 3 y 7 días). Para este análisis se emplearon las placas EasyRid (Liofilchem® s.r.l., Italia) que permitieron la cuantificación tanto del fibrinógeno como de la antitrombina III. El tiempo de protrombina se analizó mediante un cronómetro.

### 7.5 Estudios bioquímicos en plasma

Para evaluar el posible daño que producen las nanopartículas tanto al hígado como al riñón, se valoraron parámetros bioquímicos que están directamente relacionados con daños en estos dos órganos.

Los marcadores de daño hepático que se valoraron fueron:

- Fosfatasa alcalina (ALP)
- Aspartato amino-transferasa (AST)
- Alanina amino-transferasa (ALT)

Los marcadores de daño renal que se midieron fueron:

- Niveles de creatinina (CRE)
- Nitrógeno úrico en sangre (BUN)

Las muestras sanguíneas recogidas en tubos de heparina se centrifugaron a 3500 rpm durante 15 minutos a 4 °C para obtener el plasma. Las medidas se realizaron empleando los kit para análisis enzimáticos (Biosystems®, España) cuyos resultados se analizaron mediante medidas de absorbancia empleando un espectrofotómetro (Evolution 201, ThermoScientific, España).

### 7.5.1 Fosfatasa alcalina (ALP)

Como se ha descrito anteriormente la fosfatasa alcalina es una de las enzimas características de hígado cuyos niveles se encuentran aumentados en plasma en caso de producirse daño hepático. Para la medida de la enzima se empleó un kit comercial de análisis enzimáticos (Biosystems®, España) cuyo fundamento se basa en la reacción catalizada por la ALP en la que se transfiere un grupo fosfato del 4-nitrofenilfosfato al 2-amino-2-metil-1-propanol (AMP), liberando 4-nitrofenol. El compuesto 4-nitrofenol presenta un máximo de absorción a 405 nm por lo que la actividad catalítica de la enzima se determina como una medida indirecta de la formación del producto (figura 20).

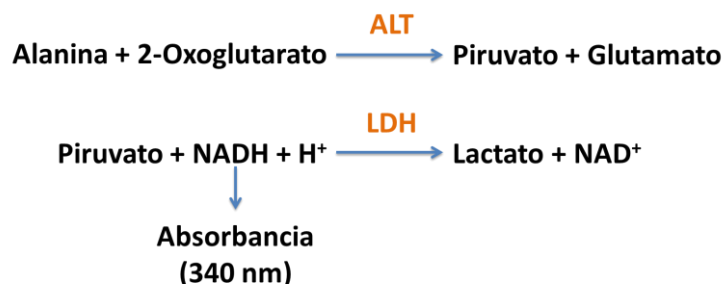


Figura 20. Fundamento teórico de la determinación de fosfatasa alcalina

### 7.5.2 Alanina aminotransferasa (ALT)

Otra de las enzimas cuyos niveles en plasma se valoraron fue la alaninaaminotransferasa, también mediante un kit de análisis enzimático (Biosystems®, España). Esta enzima cataliza la transferencia del grupo amino de la alanina al 2-oxoglutarato, formando piruvato y glutamato. En este caso el producto no se mide directamente sino que se acopla a otra reacción catalizada por la lactato deshidrogenasa (LDH), en la que la enzima cataliza el paso de piruvato a lactato mediante el gasto de NADH. Por tanto, la actividad enzimática de la ALT está relacionada

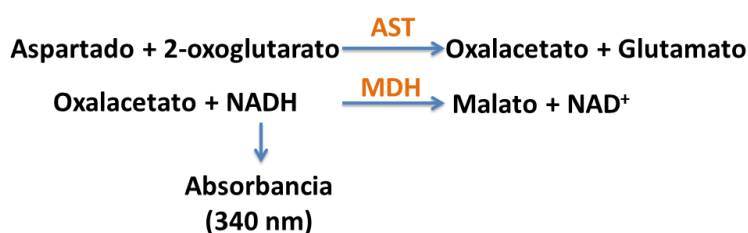
directamente con la desaparición de NADH, medido a 340 nm en el espectrofotómetro (Evolution 201, ThermoScientific, España) (figura 21).



**Figura 21.** Fundamento teórico de la determinación de alanina aminotransferasa

### 7.5.3 Aspartato aminotransferasa (AST)

La tercera enzima analizada para estudiar posibles daños hepáticos fue la Aspartato aminotransferasa. Esta enzima también cataliza la transferencia de un grupo amino, en este caso el grupo amino del aspartato al 2-oxoglutarato, formando oxalacetato y glutamato. Al igual que ocurría con la alanina aminotransferasa, la actividad enzimática se determina por una reacción acoplada en la que la malato deshidrogenasa (MDH) cataliza la formación de malato a partir de oxalacetato con oxidación de NADH (figura 22).



**Figura 22.** Fundamento teórico de la determinación de aspartato aminotransferasa

### 7.5.4 Creatinina

La creatinina se trata de un producto de desecho obtenido por la actividad metabólica de los músculos. Este producto se excreta en los riñones y una elevada concentración en plasma puede ser sinónimo de daño renal. Para comprobar que la administración de las nanopartículas no causan este daño renal, se midió la cantidad de creatinina en plasma

mediante un kit de análisis enzimático (Biosystems®, España) cuyo fundamento se basa en la reacción de la creatinina con el picrato en medio alcalino generando un complejo coloreado cuya absorbancia se mide a una longitud de onda de 500 nm en el espectrofotómetro (Evolution 201, ThermoScientific, España).

### 7.5.5 Nitrógeno ureico en sangre (BUN)

El nitrógeno ureico en sangre da una idea de la cantidad de urea que existe en circulación. Al igual que ocurre con la creatinina, la urea es un producto metabólico de desecho que se filtra en el riñón. Unos valores elevados de urea dan idea de un posible daño renal. Para ello se midió el BUN en plasma sanguíneo utilizando un kit de análisis enzimático (Biosystems®, España). La urea de la muestra, mediante la acción de la enzima ureasa pasa a ion amonio, este a su vez reacciona con hipoclorito sódico y salicilato dando lugar a indofenol. Para cuantificar la cantidad de indofenol se mide la absorbancia a 600 nm en el espectrofotómetro (Evolution 201, Thermo Scientific, España) (figura 23).

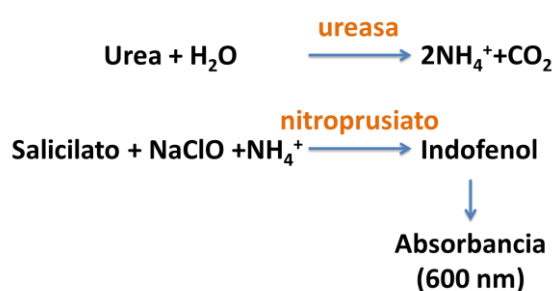


Figura 23. Fundamento teórico de la determinación de BUN

## 7.6 Defensas antioxidantes en órganos

Tras la extracción de los órganos, se congelaron (-80 °C) para un estudio enzimático posterior con el fin de evaluar las defensas antioxidantes. Para ello, los riñones, el hígado y el bazo fueron pesados y homogeneizados (Heidolph RZR 2050 electronic) a 1.200 rpm en una disolución fría de cloruro sódico (NaCl) 0,9% (w/v) con 10µL de heparina. Los homogeneizados fueron mezclados con cuatro volúmenes de Triton X-100 (1%, v/v) y los fragmentos residuales se eliminaron por centrifugación a 12.500 rpm durante 15 min.

En primer lugar se midió la cantidad de proteína mediante el método de Bradford (Hammond & Kruger 1988). Para ello se preparó el reactivo de Bradford concentrado:

- |   |              |
|---|--------------|
| • Etanol (95%) (Panreac)                  | 25 mL        |
| • Azul Comassie G250 (Sigma)              | 50 mg        |
| • Ácido ortofosfórico (85% p/v) (Panreac) | 50 mL        |
| • Agua destilada                          | Hasta 100 mL |

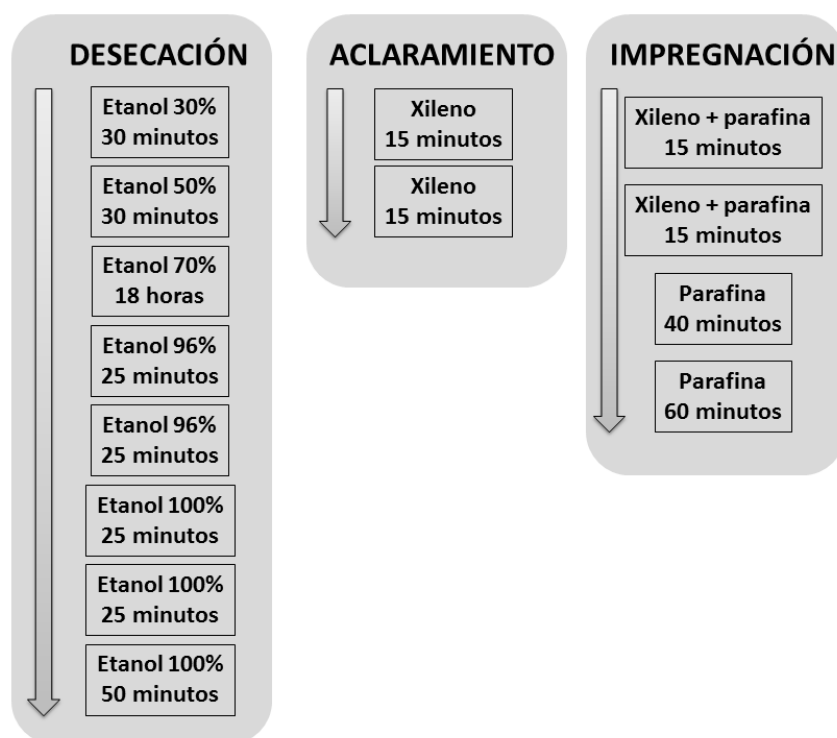
Tras la preparación del reactivo de Bradford y antes de su empleo fue necesaria su dilución en 4 volúmenes de agua destilada y su filtración. Para conocer la cantidad de proteína de las muestras se realizó una recta de calibrado con concentraciones conocidas de albúmina (entre 0,1 mg/mL y 1 mg/mL). La cuantificación de proteína contenida en las muestras estándar de la recta patrón o de las distintas muestras, se realizó añadiendo 50 µL de muestra a valorar, a 500 µL de reactivo de Bradford y se midió su absorbancia en el espectrofotómetro (Evolution 201, Thermo Scientific, España) a una longitud de onda de 595 nm.

La catalasa (CAT), la actividad de la superoxido dismutasa (SOD), la actividad de la glutatión reductasa (GSSG-R) y el contenido de glutatión total se midieron empleando los mismos protocolos que los que se emplearon en la medida de defensas antioxidantes en células y que están descritos anteriormente.

## 7.7 Estudios histológicos

Para conocer cómo afecta la administración de las nanopartículas a los órganos en los que es más fácil su acumulación, se realizaron estudios histológicos a partir de los órganos obtenidos tras el sacrificio de los animales (30 días después de la administración de los sistemas). Los órganos extraídos fueron el hígado, el bazo y los riñones.

Para el estudio histológico se tomaron muestras de los tejidos extraídos (de un tamaño aproximado de 1 cm<sup>3</sup>) y se fijaron con formol (10% v/v) a 4 °C. Tras la fijación con formol se incluyeron en parafina mediante un protocolo de lavados consecutivos con etanol de concentraciones crecientes para conseguir su deshidratación y, posteriormente la inclusión en parafina (figura 24).



**Figura 24. Protocolo de inclusión en parafina**

Tras la inclusión en parafina se realizaron cortes de un grosor máximo de 10  $\mu\text{m}$  con un micrótopo (Reichert Minot tipe). Una vez que los cortes estuvieron secos se procedió al desparafinado y a la tinción con distintos métodos de coloración “Azul alcian hemalumbre picroíndigo”, “Hematoxilina Eosina” y “Azul de Toluidina” como se detalla en la tabla 6. Una vez teñidas las muestras se analizaron mediante microscopía.

**Tabla 6. Protocolo de tinción de las muestras histológicas. Cada una de las fases de inmersión con el tiempo en minutos**

HEMATOXILINA-EOSINA		AZUL DE TOLUIDINA		TINCIÓN TRICRÓMICA	
	Tiempo (min)		Tiempo (min)		Tiempo (min)
Hematoxilina	10	Azul de Toluidina	20	Azul alcian	25
Lavado en agua	30	Lavado en agua	1	Lavado en agua	1
Eosina	2			Hemalumbre	15
Alcohol 96°	3	Alcohol 96°	30	Lavado en agua	10

Alcohol 96°	3	Alcohol 96°	30	Picrocarmín de índigo	20
Alcohol 96°	5			Lavado en agua	1
Alcohol 100°	5	Alcohol 100°	30	Alcohol 100°	5
		Alcohol 100°	30	Alcohol 100°	5
Xileno	5	Xileno	5	Xileno	5
Xileno	5	Xileno	5	Xileno	5
Xileno	5	Xileno	5	Xileno	5

## 8. ESTUDIOS ESTADÍSTICOS

El análisis estadístico se realizó mediante el programa informático SPSS Statistics 22 basado en el análisis de la varianza a través de un ANOVA de un factor. Previamente se comprobó que los datos analizados cumplen con los supuestos previos que conlleva este estudio en la distribución de la variable cuantitativa a evaluar. Una vez confirmados los requisitos de normalidad y homocedasticidad, se asumió igualdad de varianzas y normalidad. Cuando existió significación estadística con el estudio del ANOVA se procedió a realizar un contraste o comparaciones múltiples a posteriori Bonferroni. El estudio estadístico se llevó a cabo con un nivel de significación del 95% ( $p < 0,05$ )

A decorative pattern of interconnected circles and lines, resembling a molecular or network structure, is positioned on the right side of the page. The circles are in shades of red, green, and grey, and the lines are thin and grey.

# RESULTADOS





# Resultados

## 1. SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS

Con el fin de sintetizar sistemas de liberación controlada a partir de polímeros naturales como el quitosano y la albúmina, se procedió a la obtención de tres composiciones diferentes de nanopartículas (C20/A80; C50/A50 y C80/A20, nombradas en función de la proporción de cada uno de los monómeros). La síntesis se realizó mediante entrecruzamiento iónico, descrito previamente en el apartado de materiales y métodos, variando las proporciones de quitosano y albúmina. Para ello se emplearon disoluciones de BSA al 1% p/v en ácido acético 0,5 M y quitosano al 2 % p/v en ácido acético 0,5 M empleando TPP (pH 3,3) como entrecruzante.

El rendimiento de la síntesis de los diferentes sistemas fue superior al 50% en todos los casos, alcanzando un rendimiento máximo en la composición C50/A50 como se observa en la tabla 7.

Tabla 7. Rendimiento obtenido en la síntesis de las nanopartículas mediante entrecruzamiento iónico

COMPOSICIÓN NANOPARTÍCULAS	RENDIMIENTO (%)
C20/A80	69 ± 7
C50/A50	80 ± 7
C80/A20	54 ± 4

### 1.1 Cuantificación del ácido fólico unido a las nanopartículas

Tras la síntesis de nanopartículas blanco, denominadas de esta forma por la ausencia de fármaco, se procedió a la funcionalización de las mismas con NHS-folato, previamente activado para favorecer la unión a las nanopartículas. En general, a mayor cantidad de ácido fólico unido a los nanosistemas, mayor posibilidad de internalización en las células tumorales.

La cantidad de ácido fólico unido dependerá de las características especiales de cada nanopartícula, por ello se determinó la cantidad unida en cada composición estudiada, como se puede observar en la tabla 8.

De acuerdo con los resultados obtenidos, a mayor cantidad de albúmina, mayor cantidad de ácido fólico unido a la superficie de las nanopartículas, siendo las nanopartículas de mayor composición de albúmina (C20/A80) las que incorporaban mayor cantidad de ácido fólico (176,0  $\mu\text{mol}$  fólico/g NP). Así mismo, para la composición C50/A50 disminuyó la cantidad de ácido fólico incorporado (167,0  $\mu\text{mol}$  fólico/g NP) y se obtuvo la menor cantidad de ácido fólico incorporado para la composición C80/A20 (112,0  $\mu\text{mol}$  fólico/g NP). Por tanto, la composición con mayor proporción de albúmina (C20/A80) incorpora 64  $\mu\text{mol}$  de ácido fólico por cada gramo de nanopartícula más que la composición con mayor composición de quitosano (C80/A20).

**Tabla 8. Cantidad de NHS-folato unido a cada una de las distintas composiciones de nanopartículas**

COMPOSICIÓN NANOPARTÍCULAS	NHS-folato unido ( $\mu\text{mol}$ fólico/g NP)
C20/A80	176,0 $\pm$ 6,0
C50/A50	167,0 $\pm$ 13,0
C80/A20	112,0 $\pm$ 0,4

## 2. HINCHAMIENTO DE LAS NANOPARTÍCULAS

Dado que las nanopartículas están diseñadas para su empleo como sistemas de liberación controlada de fármacos, es necesario conocer el comportamiento de estos sistemas en contacto con diferentes disolventes, ya que determinará tanto su administración en organismos *in vivo* como la forma en la que se incorporará el fármaco en su interior.

Con el fin de conocer cuál era el medio en el que se conseguía un mayor hinchamiento de las nanopartículas, se estudió el comportamiento de las nanopartículas en distintos medios. Para ello se empleó un medio orgánico (etanol), agua y PBS (pH 5 y pH 7,4), teniendo en cuenta la correcta solubilidad de la doxorubicina en estos medios. Como se puede observar en la tabla 9, el hinchamiento fue superior al 70% en todas las composiciones de nanopartículas, siendo para todas ellas el etanol el medio en el que se producía un menor hinchamiento. Con el objetivo de comprobar el efecto que ejercía la fuerza iónica sobre el hinchamiento de las partículas, se comparó su comportamiento en distintos medios. Los resultados mostraron que no existían diferencias significativas entre ambos medios por lo que el hinchamiento no se ve afectado por la fuerza iónica del medio. No ocurre lo mismo en el caso del pH. Al estudiar el comportamiento de las nanopartículas en PBS a distintos pH se

observan diferencias significativas en los valores de hinchamiento en la composición con una mayor proporción de quitosano (C80/A20) entre el PBS a pH 7,5 y el PBS a pH 5.

**Tabla 9. Estudios de hinchamiento de las nanopartículas blanco en diferentes medios. \*Diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) observadas para la misma composición de nanopartículas. + Diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) observadas entre PBS a pH 7,4 y PBS a pH 5 para la composición C80/A20**

Nanopartículas	Medio de hinchamiento	Índice de hinchamiento (%)
<b>C20/A80</b>	Agua	$88,4 \pm 1,7$
	Etanol	$81,0 \pm 0,9^*$
	PBS pH 5	$90,6 \pm 0,3$
	PBS pH 7,4	$90,3 \pm 0,4$
<b>C50/A50</b>	Agua	$89,7 \pm 1,2$
	Etanol	$77,1 \pm 2,7^*$
	PBS pH 5	$90,9 \pm 1,0$
	PBS pH 7,4	$89,1 \pm 0,4$
<b>C80/A20</b>	Agua	$88,7 \pm 2,7$
	Etanol	$78,1 \pm 2,7^*$
	PBS pH 5	$90,8 \pm 1,0^+$
	PBS pH 7,4	$86,4 \pm 1,2$

### 3. INCORPORACIÓN DEL FÁRMACO A LAS NANOPARTÍCULAS

Uno de los principales factores limitantes en el empleo de las nanopartículas como sistemas de liberación controlada, es la capacidad que tienen de incorporar el fármaco; es decir, de la eficiencia de encapsulación (EE) del sistema. Lo que se busca es la forma más eficiente de incorporación en las nanopartículas, de forma que las pérdidas de fármaco sean lo más pequeñas posibles. Como se refleja en el apartado de materiales y métodos, la incorporación del fármaco a las nanopartículas se realizó en un paso posterior a su síntesis, y se realizó aprovechando las características de la doxorubicina, ya que su carga varía en función del pH del medio (Mohan & Rapoport 2010), y las características de los materiales de partida de las nanopartículas.

En la tabla 10, queda reflejada la cantidad absoluta de fármaco que incorporan las nanopartículas blanco, así como su eficiencia de incorporación.

En el caso de las nanopartículas sin funcionalizar, la mayor cantidad de fármaco incorporado se consiguió en el caso de las nanopartículas C50/A50, donde se consiguió una encapsulación de  $10,7 \mu\text{g}$  de DOX/mg NP, lo que corresponde a un 71% de la eficiencia de encapsulación. La nanopartículas de composición C80/A20, es decir, las que tienen mayor

composición de quitosano, fueron las que presentaron una eficiencia de encapsulación del 55%, equivalente a 8,2 µg de DOX/mg NP. La menor eficiencia de encapsulación del fármaco se obtuvo en la formulación con mayor cantidad de albúmina, C20/A80, donde la eficiencia de encapsulación (EE) fue del 34%.

La existencia de diferencias significativas entre las distintas cantidades de fármaco encapsulado indica que la composición de las nanopartículas afecta directamente a la capacidad de carga de fármaco de las mismas.

**Tabla 10. Cantidad de fármaco incorporado y eficiencia de incorporación de las nanopartículas sin funcionalizar. \*Diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). Media  $\pm$  SD (n=3)**

Nanopartículas	Cantidad de DOX incluida en las nanopartículas (µg DOX/mg NP)	Eficiencia de incorporación (%)
C20/A80	5,2 $\pm$ 1,8 *	34
C50/A50	10,7 $\pm$ 1,6 *	71
C80/A20	8,2 $\pm$ 2,1 *	55

Al realizar el mismo estudio en las nanopartículas funcionalizadas con ácido fólico, los datos que se obtienen siguen presentando la misma tendencia que en el caso de las nanopartículas sin funcionalizar (tabla 11). Así, las nanopartículas de composición C50/A50F muestran la mayor eficiencia de encapsulación (12,11 µg DOX/mg NP), y la composición con mayor cantidad de albúmina (C20/A80F) la que presenta una menor eficiencia de encapsulación (6,94 µg DOX/mg NP).

Las nanopartículas blanco funcionalizadas difieren de las nanopartículas sin ácido fólico en que incorporan mayor cantidad de fármaco para todas las composiciones. La diferencia de la eficiencia de incorporación entre las nanopartículas funcionalizadas y las nanopartículas sin funcionalizar está en torno al 10 % en todos los casos (12 %, 10 % y 14 % para las composiciones C20/A80, C50/A50 y C80/A20 respectivamente)

**Tabla 11. Cantidad de fármaco incorporado y eficiencia de incorporación de las nanopartículas funcionalizadas. \*Diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). Todos los datos se expresan como media  $\pm$  SD (n=3)**

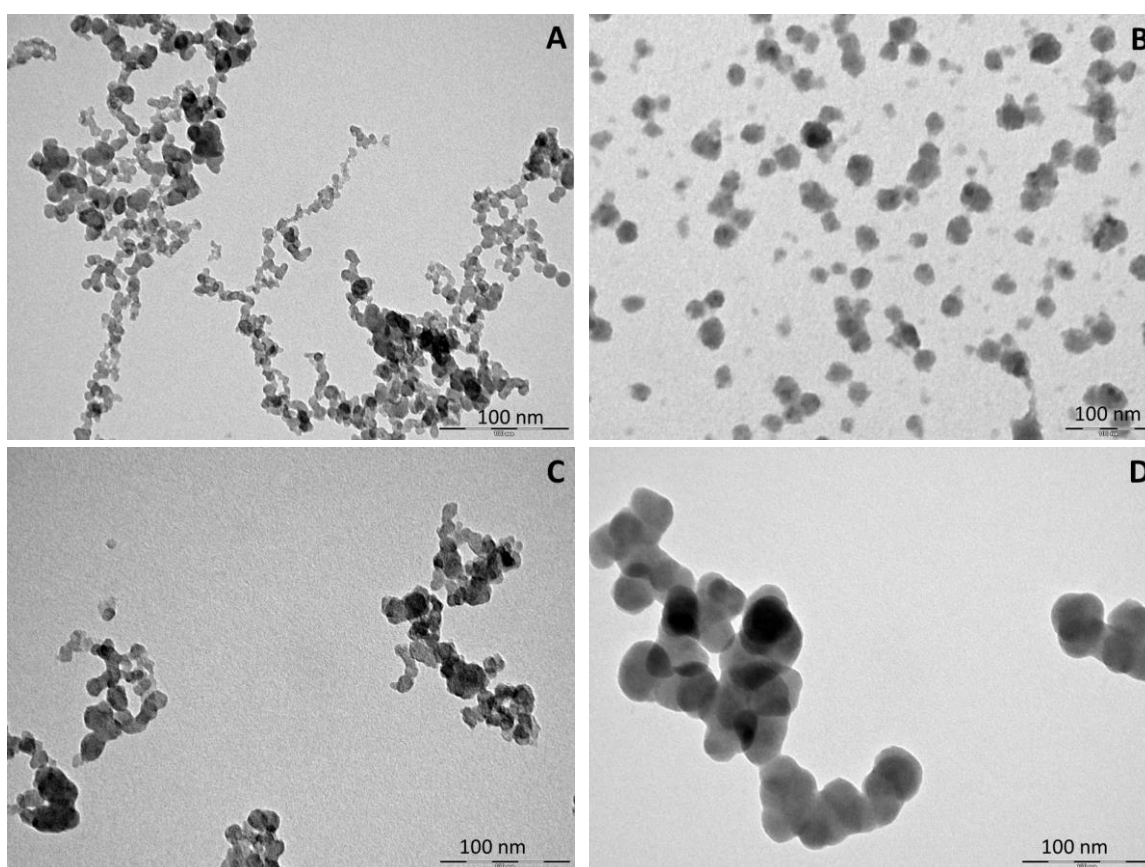
Nanopartículas	Cantidad de DOX incluida en las nanopartículas (µg DOX/mg NP)	Eficiencia de incorporación (%)
C20/A80F	6,94 $\pm$ 0,46 *	46
C50/A50F	12,11 $\pm$ 0,99 *	81
C80/A20F	10,31 $\pm$ 0,72 *	69

## 4. CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS

### 4.1 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

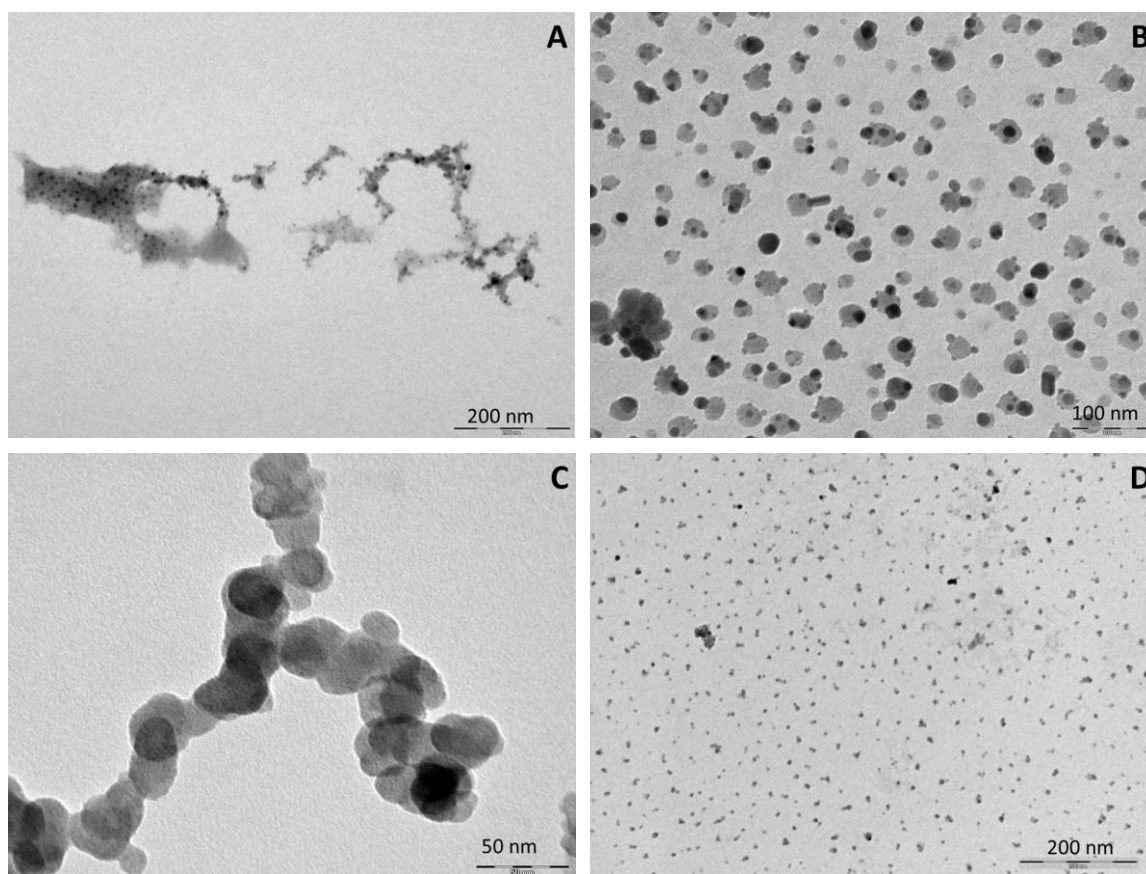
Una de las principales características a tener en cuenta en los sistemas de liberación controlada de fármacos, es el tamaño y la morfología de los mismos, ya que son factores limitantes para su biodistribución. La determinación de ambos parámetros se llevó a cabo mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM).

En la figura 25, se muestran las imágenes obtenidas mediante esta técnica para las nanopartículas con mayor composición de albúmina (C20/A80), tanto de las nanopartículas blanco sin funcionalizar y funcionalizadas (C20/A80 y C20/A80F), como de las nanopartículas con el fármaco incorporado, sin funcionalizar y funcionalizadas (C20/A80-DOX y C20/A80F-DOX). Como se puede observar en las imágenes, se obtuvieron nanopartículas esféricas, todas ellas de tamaño inferior a 100 nm. En estas imágenes aparecen nanopartículas individualizadas sin tendencia a formar grandes agregados cuando se encuentran en estado seco.



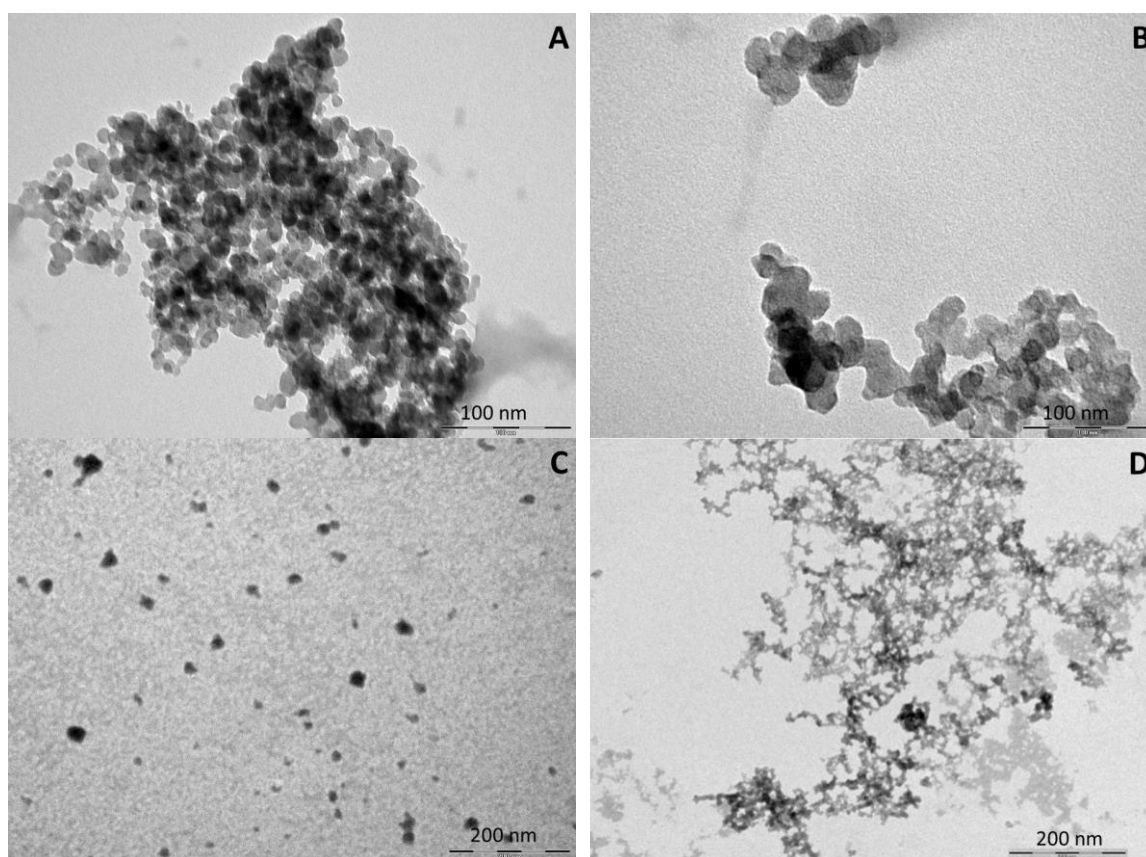
**Figura 25.** Imágenes obtenidas mediante microscopía de transmisión electrónica (TEM) de las nanopartículas: (A) nanopartículas C20/A80 (B) nanopartículas C20/A80-DOX (C) nanopartículas C20/A80F (D) nanopartículas C20/A80F-DOX. La barra oscura representa el tamaño de escala.

Para las nanopartículas de composición C50/A50, se obtuvieron resultados similares, como se refleja en la figura 26, también se observan partículas de tamaño inferior a 100 nm, individualizadas y con una morfología esférica. Ni la inclusión del fármaco ni la adición del ácido fólico parecen tener consecuencias en la forma de las nanopartículas y tampoco parecen alterar las interacciones entre las mismas, al igual que ocurría en la composición C20/A80.



**Figura 26.** Imágenes obtenidas mediante microscopía de transmisión electrónica (TEM) de las nanopartículas: (A) nanopartículas C50/A50 (B) nanopartículas C50/A50-DOX (C) nanopartículas C50/A50F (D) nanopartículas C50/A50F-DOX. La barra oscura representa el tamaño

La diferencia en las composiciones de las nanopartículas no parece afectar en gran medida a la morfología ni al tamaño de las nanopartículas. Como se observa en la figura 27, los resultados para la tercera composición, con mayor proporción de quitosano (C80/A20), al igual que ocurría en las otras composiciones, las partículas siguen mostrando morfología esférica, tamaño nanométrico y una escasa agregación entre ellas.



**Figura 27.** Imágenes obtenidas mediante microscopía de transmisión electrónica (TEM) de las nanopartículas: (A) nanopartículas C80/A20 (B) nanopartículas C80/A20-DOX (C) nanopartículas C80/A20F (D) nanopartículas C80/A20F-DOX. La barra oscura representa el tamaño

A partir de estas imágenes, se pudo tener una idea preliminar de la dispersión de tamaños de las nanopartículas en estado seco, como se refleja en la tabla 12. Como se apreciaba en las imágenes, el tamaño de todas las nanopartículas es inferior a los 100 nm, oscilando entre 8,2 y 34,6 nm.

**Tabla 12.** Diámetros medios y polidispersidad obtenidos a partir de las fotografía de TEM de las nanopartículas

Composición		Tamaño (nm)
<b>C20/A80</b>	C20/A80	$8,9 \pm 1,8$
	C20/A80F	$11,6 \pm 2,5$
	C20/A80-DOX	$27,2 \pm 4,3$
	C20/A80F-DOX	$31,5 \pm 5,4$
<b>C50/A50</b>	C50/A50	$8,2 \pm 1,1$
	C50/A50F	$25,2 \pm 6,5$
	C50/A50-DOX	$30,4 \pm 3,1$
	C50/A50F-DOX	$15,3 \pm 2,6$
<b>C80/A20</b>	C80/A20	$11,5 \pm 2,2$
	C80/A20F	$34,6 \pm 5,4$
	C80/A20-DOX	$27,8 \pm 6,4$
	C80/A20F-DOX	$14,8 \pm 3,4$



En todos los casos, el menor tamaño de las nanopartículas correspondía a las partículas sin fármaco no vectorizadas. Una vez que las nanopartículas incorporaban la doxorubicina, tendían a aumentar su tamaño. También se aprecia cómo la unión del fólculo se traduce en un incremento del tamaño, excepto en las composiciones C50/A50F-DOX y C80/A20F-DOX, que disminuyen su tamaño respecto a su misma composición sin fármaco. Al realizar el estudio estadístico ANOVA se observó que no existían diferencias significativas entre los tamaños de las tres composiciones en las nanopartículas blanco sin funcionalizar, así como tampoco se observaron diferencias significativas entre los tamaños de las nanopartículas sin fólculo una vez incorporado el fármaco. En el caso de las nanopartículas funcionalizadas, sí se observaron diferencias significativas entre la composición C20/A80 y las composiciones C50/A50 y C80/A20.

#### **4.2 Medidas de *Dynamic Light Scattering* (DLS) y potencial Z**

Otra técnica empleada para determinar el tamaño de las nanopartículas es mediante medidas de dispersión de la luz. Esta técnica permite la medida del tamaño de las nanopartículas en suspensión, a diferencia de la microscopía electrónica de transmisión en la que las muestras se encuentran sin disolvente. Los datos de tamaño obtenidos por esta técnica se recogen en la tabla 13. Como se puede observar en todos los casos el tamaño de las nanopartículas es mayor que el obtenido en microscopía (tabla 12).

Comparando los valores entre los distintos nanosistemas, se observa que al igual que ocurría en el caso de las medidas de tamaño obtenidas a partir de las imágenes de TEM, las nanopartículas al incluir el fármaco tenían un tamaño mayor que las nanopartículas sin fármaco. Sin embargo, aquí se observa una tendencia diferente que en el caso del TEM, y es que las nanopartículas vectorizadas tienen un tamaño inferior al de las nanopartículas sin funcionalizar.

Tabla 13. Diámetros medios y polidispersidad obtenidos a partir de la técnica DLS

Composición	Tamaño (nm)
<b>C20/A80</b>	C20/A80
	C20/A80F
	C20/A80-DOX
	C20/A80F-DOX
<b>C50/A50</b>	C50/A50
	C50/A50F
	C50/A50-DOX
	C50/A50F-DOX
<b>C80/A20</b>	C80/A20
	C80/A20F
	C80/A20-DOX
	C80/A20F-DOX

Las medidas de potencial z son una herramienta fundamental para conocer las propiedades de una dispersión coloidal, como la que se produce al incorporar en la sangre las nanopartículas con el fármaco incluido. Una dispersión coloidal presentará diferentes características en función del coloide, por lo que las propiedades de éste serán determinantes y su conocimiento permite modificar las suspensiones dependiendo de las necesidades y las aplicaciones de las partículas. Dado que la carga de superficie no puede medirse, se realiza una medida que consiste en la determinación de la diferencia de potencial en la que se unen la capa difusa y la capa de Stern y que se conoce como potencial Z. Esta medida indica cambios en el potencial de superficie y las fuerzas de repulsión que pueden establecerse entre los coloides. En la tabla 14 aparece el valor del potencial Z de las nanopartículas tanto funcionalizadas como sin funcionalizar.

Tabla 14. Medida del potencial z de las nanopartículas

Composición	Potencial Z
<b>C20/A80</b>	C20/A80
	C20/A80F
	C20/A80-DOX
	C20/A80F-DOX
<b>C50/A50</b>	C50/A50
	C50/A50F
	C50/A50-DOX
	C50/A50F-DOX
<b>C80/A20</b>	C80/A20
	C80/A20F
	C80/A20-DOX
	C80/A20F-DOX

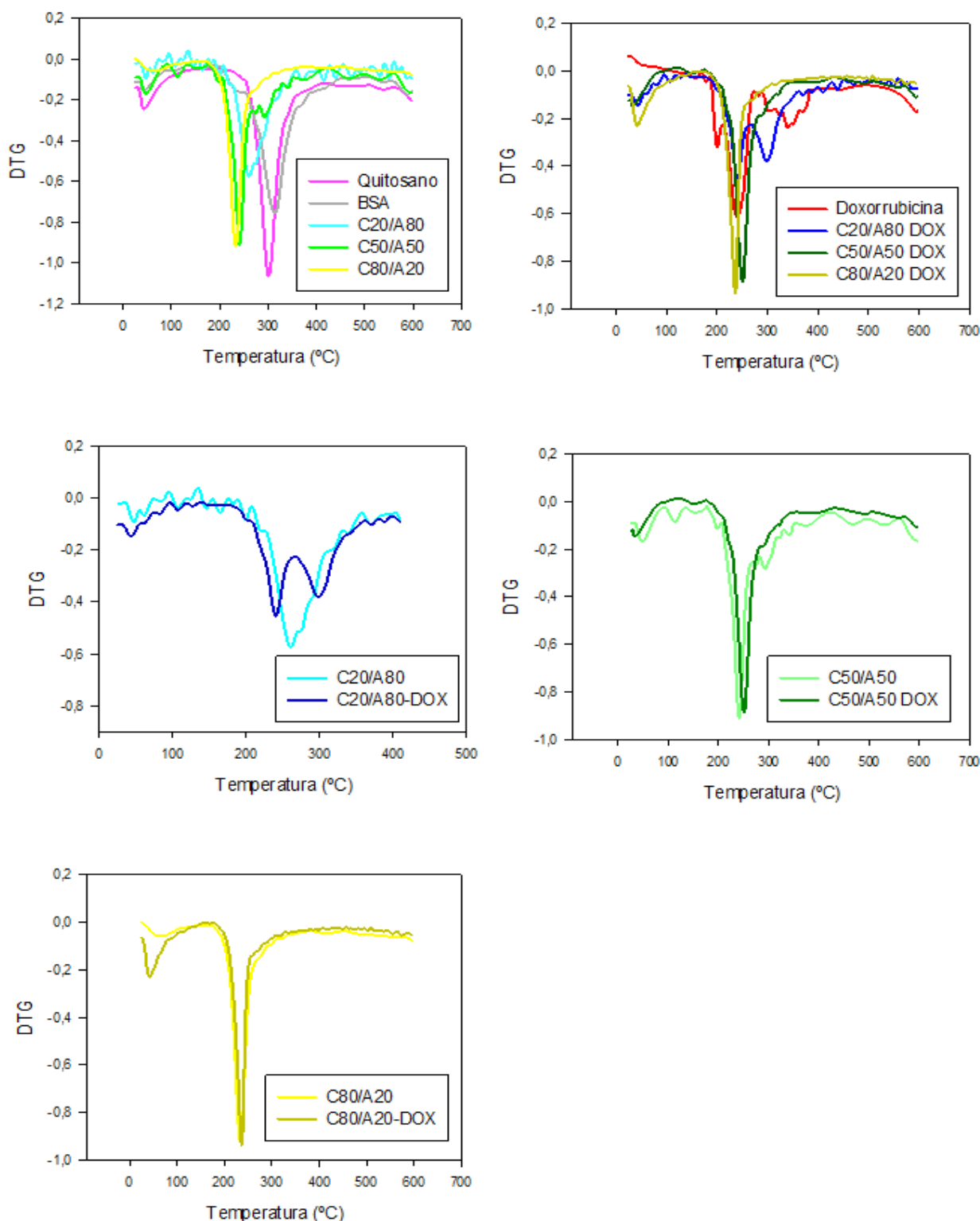
En todos los casos se observó cómo la incorporación del fármaco estaba relacionada con una disminución del potencial  $z$ , llegando a ser negativo en el caso de las nanopartículas con una menor cantidad de quitosano en su composición (C20/A80). Esta disminución fue menos acusada cuanto mayor era la proporción de quitosano presente en la composición de las nanopartículas. En el caso de las nanopartículas funcionalizadas con fólico se observa una misma tendencia en los valores de potencial  $z$  para las distintas composiciones, esta diferencia es mayor en el caso de la composición C50/A50.

#### **4.3 Análisis termogravimétrico (TGA)**

Con el objetivo de evaluar la estabilidad térmica de las nanopartículas, se llevó a cabo un estudio termogravimétrico variando la temperatura de exposición tanto de las nanopartículas sintetizadas como de los de los monómero que las constituyen.

De acuerdo con la figura 28, tanto las partículas sintetizadas como los materiales de los que están compuestos (quitosano y albúmina) permanecieron estables a elevadas temperaturas.

La pérdida de masa que se produce en los distintos sistemas nanoparticulados se determinó mediante la representación de la primera derivada del peso (DTG) frente a la temperatura (figura 28). Los resultados ponen de manifiesto que existe una diferencia de comportamiento entre las nanopartículas sintetizadas y el quitosano y la albúmina. La degradación térmica en todos los casos transcurre en un único proceso, la temperatura de degradación fue aproximadamente de 317 °C para la albúmina y de 299 °C para el quitosano. Todas las composiciones de nanopartículas sintetizadas muestran una temperatura de degradación inferior a la que presentan el quitosano y la albúmina, sin embargo, la temperatura de degradación es superior en todos los casos a 200 °C, lo que permite asegurar que la estabilidad térmica de los nanosistemas es muy elevada. Al comparar las tres composiciones de nanopartículas, se observó un ligero aumento de la temperatura de degradación al aumentar progresivamente la proporción de albúmina en las partículas sintetizadas.



**Figura 28. Primera derivada de TGA (DTG) de: monómeros de partida, doxorubicina, nanopartículas sintetizadas blanco y nanopartículas con fármaco incluido**

En la figura 28 también se muestra el comportamiento térmico de la doxorubicina, y de las nanopartículas cargadas con el fármaco. La degradación de la doxorubicina se produce en dos etapas, la primera de ellas presenta una temperatura de descomposición de 200 °C, y en la segunda etapa la temperatura es de 237 °C. En el caso de las nanopartículas cargadas con fármaco, las composiciones C50/A50-DOX y C80/A20-DOX muestran unos perfiles de degradación térmica similares a los de las nanopartículas sin cargar. Aunque la composición en la composición C50/A50 tiene una pérdida de masa con una diferencia de 10 °C.

Sólo para la composición C20/A80-DOX hay un perfil de degradación diferente al de las partículas sin fármaco, observándose dos picos a las temperaturas de 239 °C y 299 °C, temperaturas que en ambas etapas son más elevadas que las que presenta el fármaco solo.

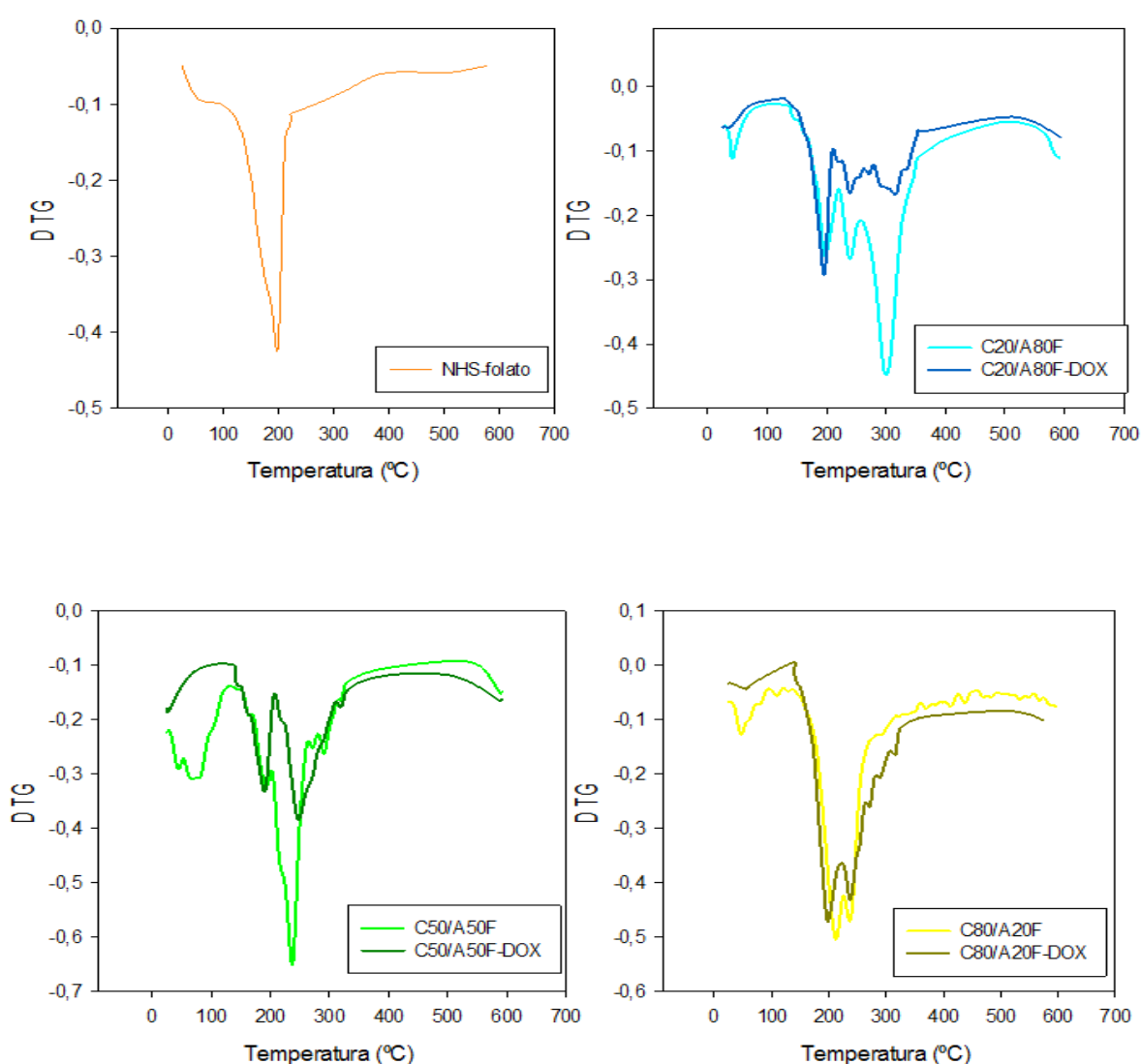
En la tabla 15 se especifican los valores de temperaturas de degradación de cada composición polimérica analizada, así como de los materiales constituyentes. En dicha tabla se puede observar cómo todas las nanopartículas presentan una etapa de degradación térmica superior a los 200 °C con una pérdida de masa de un 20-30 %. Las nanopartículas C20/A80-DOX revelaron dos etapas de degradación, uno de ellos correspondiente a la temperatura de 239 °C que es muy similar a la primera etapa de degradación de la doxorubicina.

**Tabla 15. Datos correspondientes al estudio de descomposición térmica de: los materiales de partida (BSA, quitosano y doxorubicina), nanopartículas sin fármaco (C20/A80, C50/A50 y C80/A20) y nanopartículas con el fármaco incluido (C20/A80-DOX, C50/A50-DOX y C80/A20-DOX)**

Muestra	Temperatura de la primera derivada (°C) de la etapa de descomposición		Pérdida de masa (%) en el paso de descomposición térmica		Pérdida de masa (%) a temperaturas superiores a 600 °C
Doxorubicina	200	237,6	70,4	70,4	70,4
Quitosano	299		43		100
BSA	316,7		46		96,1
C20/A80	261		26,7		59,4
C20/A80-DOX	239	299	25,7		59,4
C50/A50	239,5		28,7		81,3
C50/A50-DOX	248,1		27,7		58,2
C80/A20	235		24,7		53,9
C80/A20-DOX	235		23,6		48,2

Al igual que se analizó el comportamiento térmico de las nanopartículas sin funcionalizar con y sin doxorubicina, se estudió el de las nanopartículas funcionalizadas. Como

se puede observar en la figura 29, los perfiles de degradación de las nanopartículas funcionalizadas fueron diferentes de los perfiles de las nanopartículas blanco no funcionalizadas. En todos los casos, las nanopartículas vehiculizadas mostraron dos picos de degradación, uno con una pequeña pérdida de masa en torno a los 190 °C. El hecho de que esta etapa esté presente en los perfiles de todas las composiciones tanto con fármaco como sin él parece indicar que se debe al fólculo unido a las nanopartículas y no al pico característico de la doxorubicina.



**Figura 29. Primera derivada de TGA (DTG) de: ácido fólico, nanopartículas blanco funcionalizadas y nanopartículas con fármaco incluido**

En la tabla 16 aparecen los valores de temperatura correspondientes a las gráficas de degradación de las nanopartículas funcionalizadas con ácido fólico así como de las nanopartículas funcionalizadas con ácido fólico y el fármaco incluido.

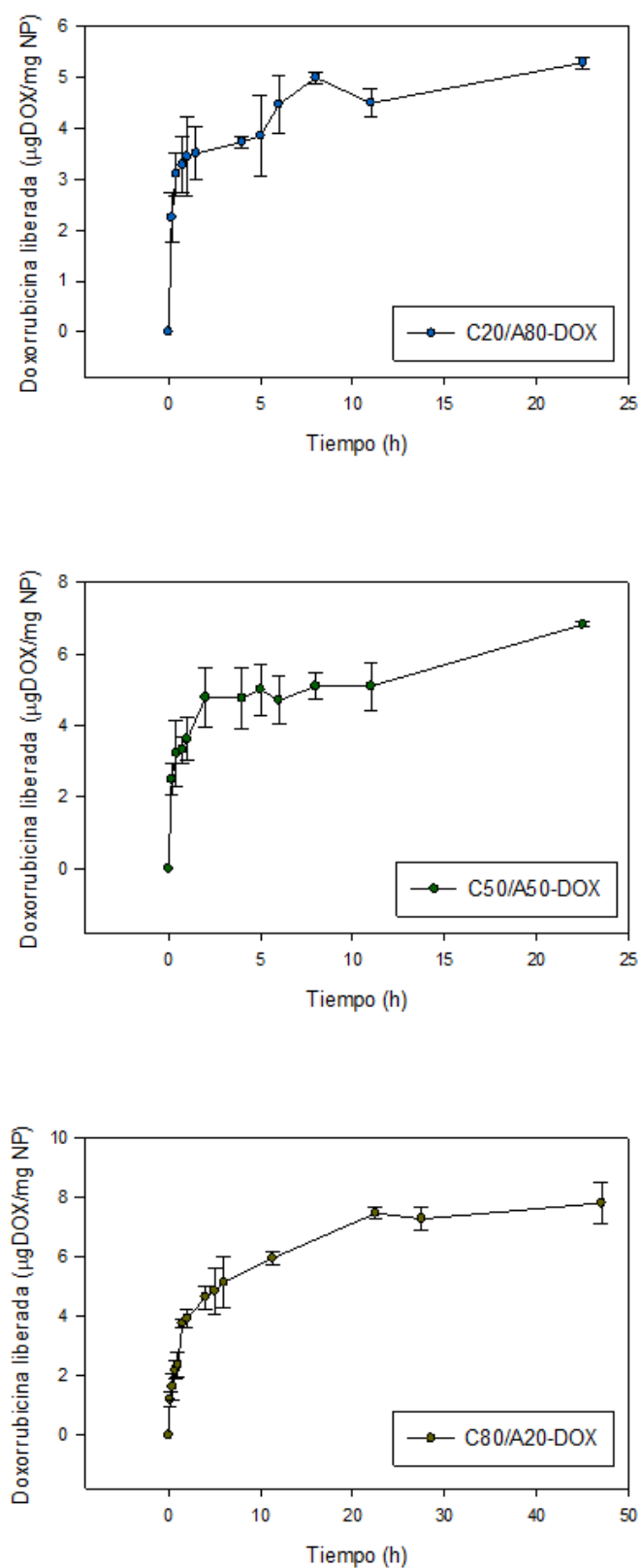
**Tabla 16. Datos correspondientes al estudio de descomposición térmica de: nanopartículas funcionalizadas sin fármaco (C20/A80F, C50/A50F y C80/A20F) y nanopartículas funcionalizadas con el fármaco incluido (C20/A80F-DOX, C50/A50F-DOX y C80/A20F-DOX)**

Muestra	Temperatura de la primera derivada (°C) de la etapa de descomposición		Pérdida de masa (%) en el paso de descomposición térmica		Pérdida de masa (%) a temperaturas superiores a 600 °C
C20/A80F	190	301,2	39,8		72
C20/A80F-DOX	197,5		11,8		48
C50/A50F	237,9		58,3		100
C50/A50F-DOX	191,9	249,9	17,5	29,4	66
C80/A20F	232,5		22,7		72,3
C80/A20F-DOX	197,1	237,7	13,7	30,1	78

## 5. ESTUDIOS DE LIBERACIÓN DEL FÁRMACO

Tras haber caracterizado los sistemas y comprobar su tamaño nanométrico, su morfología esférica y su estabilidad a elevadas temperaturas, se procedió a determinar cómo se produce la liberación del fármaco incluido. Al tratarse de sistemas de liberación controlada es necesario conocer cómo se va a producir la salida del fármaco para así poder extrapolar lo que sucedería en el organismo tras su administración. Para ello se realizaron los estudios de liberación en un medio a pH fisiológico que simulase las condiciones presentes en el organismo.

En la figura 30 se ha representado la concentración de doxorrubicina liberada ( $\mu\text{g DOX/mg NP}$ ) frente al tiempo (horas). Los estudios de liberación se llevaron a cabo durante una semana, aunque en la figura sólo se refleja el tiempo en el que se alcanza la máxima concentración de fármaco liberado. Para determinar la concentración de doxorrubicina liberada, se tuvieron en cuenta los cambios de volumen propios de la técnica.



**Figura 30. Perfiles de liberación de la doxorubicina encapsulada en las nanopartículas no vehiculizadas: C20/A80-DOX; C50/A50-DOX y C80/A20-DOX**



En todos los casos se observó un efecto *burst* inicial de 10 minutos de duración en el que se produjo una rápida liberación del fármaco. En el caso de las nanopartículas C20/A80-DOX esta liberación fue la equivalente a un 43 % de la carga de fármaco, mientras que en las composiciones C50/A50-DOX y C80/A20-DOX, dicho efecto *burst* corresponde al 23% y 14%, respectivamente.

El máximo de liberación del fármaco se obtuvo en el caso de las nanopartículas C20/A80-DOX con una liberación de  $5,29 \pm 0,11$   $\mu\text{g DOX/mg NP}$  correspondiente a un 100% del fármaco incorporado. La máxima liberación se alcanzó a las 22,5 horas. En el caso de las nanopartículas de composición C50/A50-DOX la liberación fue de  $6,82 \pm 0,08$   $\mu\text{g DOX/mg NP}$  que corresponde al 64% del fármaco incorporado, alcanzado a las 22,5 horas. Las nanopartículas de composición C80/A20-DOX liberaron  $7,80 \pm 0,21$   $\mu\text{g DOX/mg NP}$ , un 95% del fármaco incorporado. En esta composición C80/A20-DOX el máximo de liberación se alcanzó a las 47 horas.

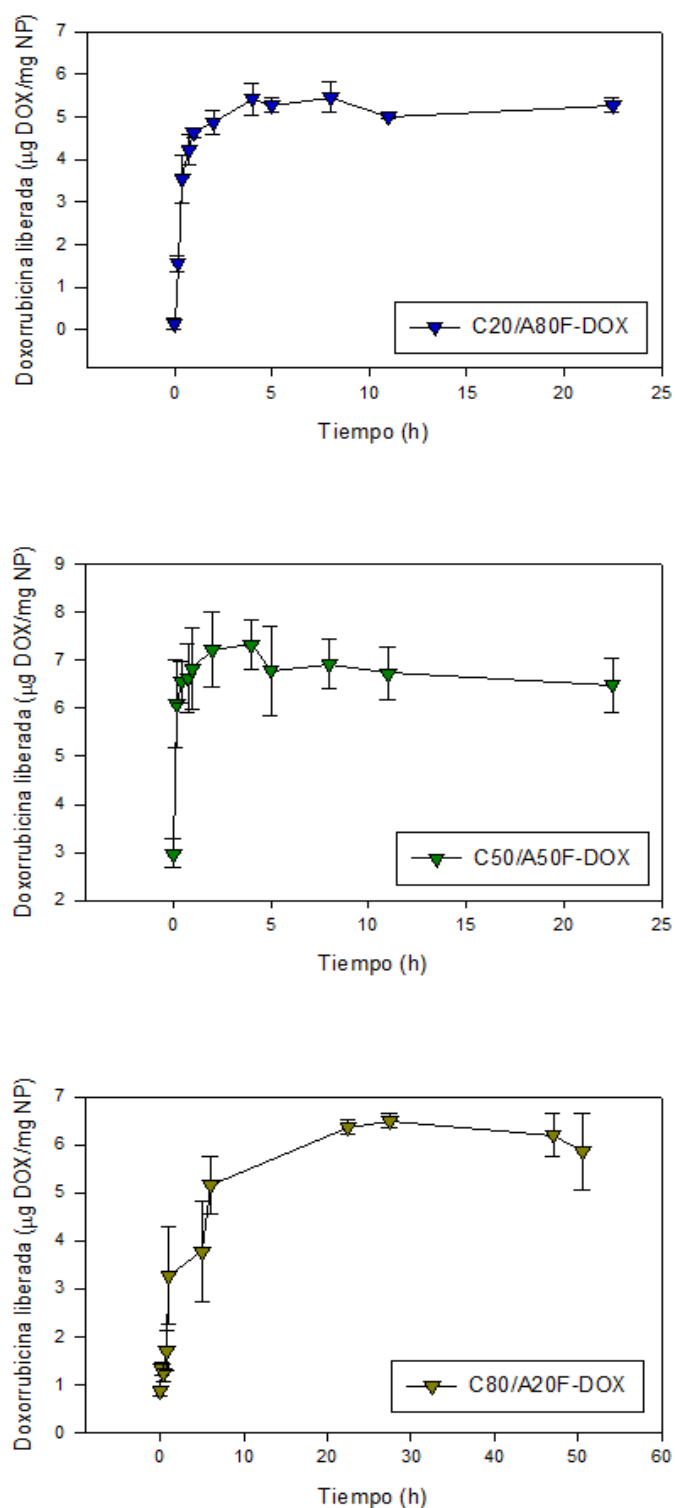
Al comparar los resultados durante la primera etapa (tabla 17), se observa una liberación más rápida de doxorrubicina en el caso de las nanopartículas C80/A20-DOX que en las otras dos formulaciones. En la segunda etapa de liberación se observa cómo la composición C80/A20-DOX sigue siendo la que lleva asociada una mayor velocidad de liberación llegando a ser la velocidad el doble que en el caso de la composición C20/A80-DOX.

**Tabla 17. Etapas de liberación de la Doxorrubicina encapsulada en las nanopartículas no vehiculizadas: C20/A80-DOX; C50/A50-DOX y C80/A20-DOX. K representa el valor constante cinética de la liberación, que tenía un buen coeficiente de correlación ( $r^2$ )**

	Tiempo (h)	K ( $\mu\text{g DOX/h}$ )	Tiempo (h)	K ( $\mu\text{g DOX/h}$ )
<b>C20/A80-DOX</b>	0,42 - 1	0,597 ( $r^2=0,998$ )	1 – 22,5	0,0807 ( $r^2=0,880$ )
<b>C50/A50-DOX</b>	0,42 - 1	0,657 ( $r^2=0,871$ )	1 – 22,5	0,1063 ( $r^2=0,955$ )
<b>C80/A20-DOX</b>	0,42 - 1	1,274 ( $r^2=0,951$ )	1 – 22,5	0,1669 ( $r^2=0,964$ )

Para las nanopartículas funcionalizadas con ácido fólico, los resultados de la liberación de doxorrubicina se muestran en la figura 31. El máximo de liberación del fármaco se obtuvo en las nanopartículas C20/A80F-DOX con una concentración de  $5,4 \pm 0,4$   $\mu\text{g DOX/mg NP}$  que corresponde a un 77,8% del fármaco incorporado en estas partículas. La máxima liberación se alcanzó a las 4 horas. En el caso de las nanopartículas de composición C50/A50F-DOX la liberación fue de  $7,04 \pm 0,52$   $\mu\text{g DOX/mg NP}$  que corresponde al 58% del fármaco incorporado, que se alcanzó a las 4 horas. Las nanopartículas de composición C80/A20F-DOX

liberaron  $6,49 \pm 0,27 \mu\text{g DOX/mg NP}$ , un 63% del fármaco incorporado, alcanzando el máximo de liberación a las 27,5 horas.



**Figura 31. Perfiles de liberación de la doxorubicina encapsulada en las nanopartículas vehiculizadas C20/A80-DOX; C50/A50F-DOX y C80/A20F-DOX**

En todos los casos se observó, al igual que ocurría con las nanopartículas sin funcionalizar, un efecto *burst* inicial, de 10 minutos. La liberación correspondiente a este efecto *burst* es de 22%, 50% y 11% para C20/A80F-DOX, C50/A50F-DOX y C80/A20F-DOX respectivamente. Tras esta primera fase de liberación rápida del fármaco se vuelven a observar dos etapas de liberación. Se realizó un ajuste por mínimos cuadrados para obtener la velocidad de liberación del fármaco correspondiente a ambas etapas (tabla 18).

Todas las composiciones de nanopartículas funcionalizadas alcanzaron el máximo de liberación antes que sus homólogas no funcionalizadas. Así, las nanopartículas de composición C20/A80 y C50/A50 llega a ser de 4 horas respecto a las 22,5 horas a las que se alcanzaba el máximo en las nanopartículas sin funcionalizar y el máximo de liberación alcanzado por las nanopartículas de composición C80/A20-DOX sin fólico disminuye de 47 horas a 27,5 horas cuando están funcionalizadas.

**Tabla 18. Etapas de liberación de la Doxorrubicina encapsulada en las nanopartículas vehiculizadas: C20/A80F-DOX; C50/A50F-DOX y C80/A20F-DOX. K representa el valor constante cinética de la liberación y  $r^2$  el coeficiente de correlación**

	Tiempo (h)	K ( $\mu\text{g DOX/h}$ )	Tiempo (h)	K ( $\mu\text{g DOX/h}$ )
<b>C20/A80F-DOX</b>	0,42 - 1	1,84 ( $r^2=0,99$ )	1 – 22,5	-0,07 ( $r^2=0,68$ )
<b>C50/A50F-DOX</b>	0,42 - 1	0,47 ( $r^2=0,88$ )	1 – 22,5	-0,03 ( $r^2=0,50$ )
<b>C80/A20F-DOX</b>	0,42 - 1	3,35 ( $r^2=0,86$ )	1 – 22,5	0,14 ( $r^2=0,82$ )

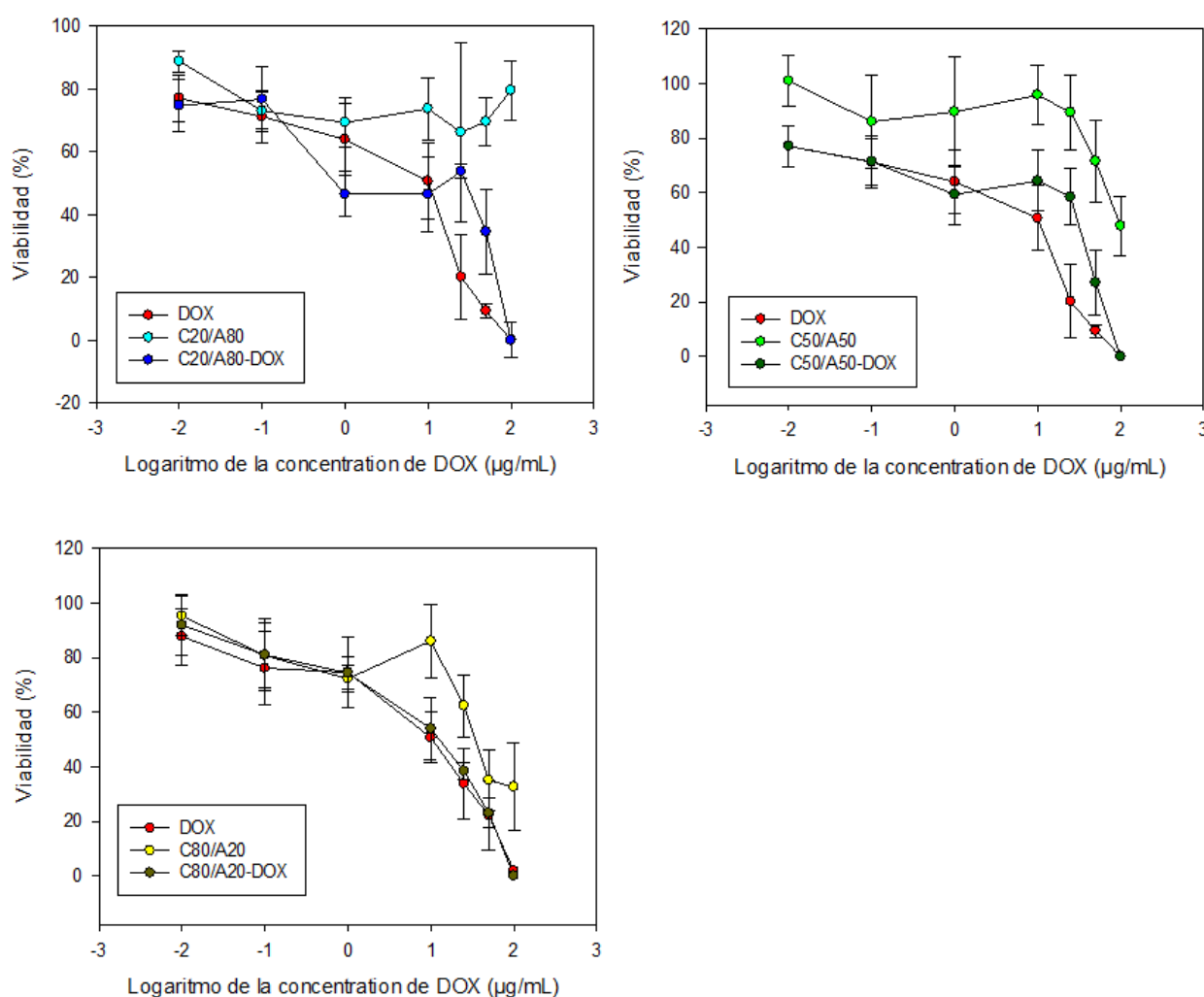
## 6. ESTUDIOS DE VIABILIDAD CELULAR

### 6.1 Curva dosis-respuesta

Para conocer la viabilidad de las nanopartículas, se estudió el comportamiento de distintas concentraciones de nanopartículas blanco, funcionalizadas y sin funcionalizar, y con el fármaco incluido durante 24 horas, empleando el fármaco en disolución como control en distintas líneas celulares (MCF7, HeLa y T47D). Las concentraciones de nanopartículas a las que se realizó el estudio fueron las equivalentes a una concentración de doxorrubicina entre 0,01  $\mu\text{g/mL}$  y 100  $\mu\text{g/mL}$ , cuya correspondencia en cantidad de nanopartículas no funcionalizadas aparece en la tabla 4 y para las funcionalizadas en la tabla 5, en función de la cantidad de fármaco incorporado en cada nanopartícula.

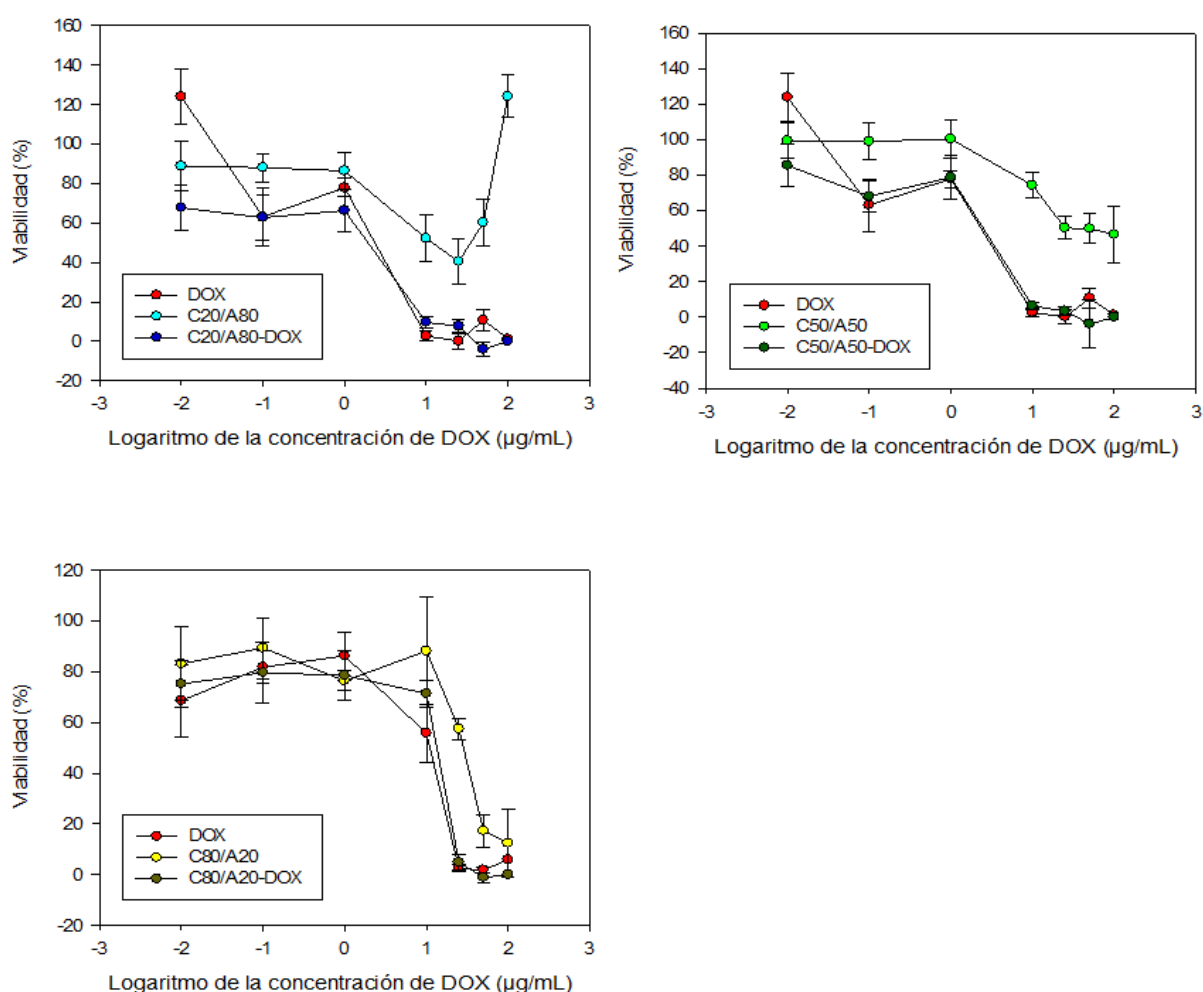
Los resultados expuestos en la figura 32 muestran la viabilidad de la línea celular MCF7 a diferentes concentraciones de las tres composiciones. En todos los casos se produce

una muerte celular completa tanto para el fármaco libre como para las nanopartículas con fármaco incorporado. Las mayores diferencias debidas a la composición de las nanopartículas se observa para los sistemas sin fármaco incorporado. Así, la composición C20/A80 no sólo no llega a producir muerte celular sino que mantiene una viabilidad constante del 80% incluso a las concentraciones más altas (19,23 mg NP/mL). En el caso de la composición C50/A50, la viabilidad se mantiene superior al 40 %, incluso para concentraciones equivalentes a 100  $\mu\text{g/mL}$  de DOX (9,34 mg NP/mL). Es la composición con mayor proporción de quitosano (C80/A20) la que, a elevadas concentraciones (12,20 mg NP/mL), un descenso de la viabilidad al 20%.



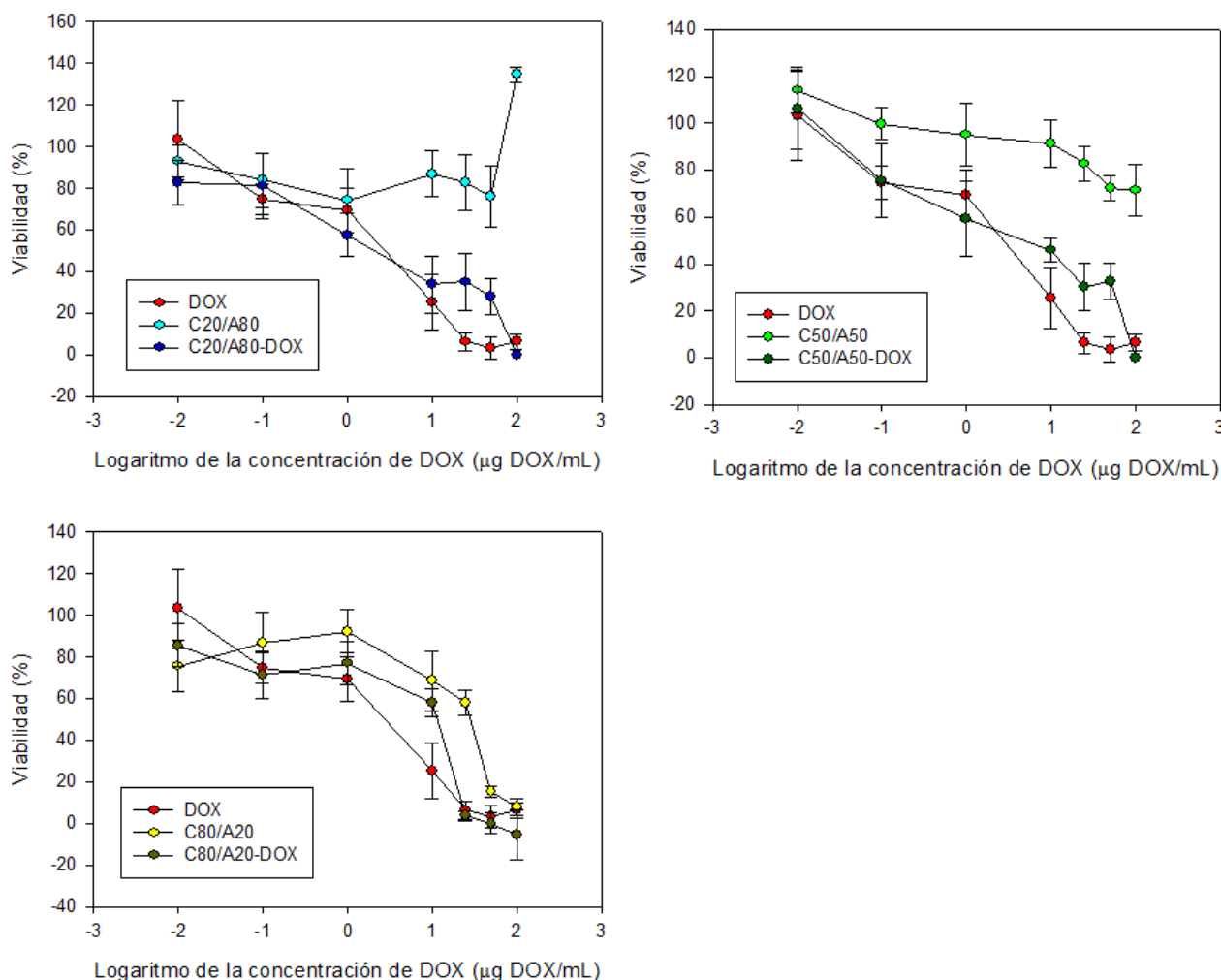
**Figura 32.** Citotoxicidad en la línea celular MCF7 de las nanopartículas blanco y con fármaco a rango de concentración equivalente a 0,01 y 100  $\mu\text{g/mL}$  de doxorubicina de las composiciones C20/A80, C50/A50 y C80/A20

La línea celular HeLa (figura 33), muestra unos resultados similares a los observados en el caso de las células MCF7. Para la composición con mayor cantidad de albúmina (C20/A80), la viabilidad no llega a descender por debajo del 40%; incluso, a elevadas concentraciones de nanopartículas (9,61 y 19,23 mg NP/mL) equivalentes a unas concentraciones de doxorrubicina de 50 y 100  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente, la viabilidad aumenta. Al igual que ocurría en la línea celular MCF7, la composición C50/A50 a elevadas concentraciones de nanopartículas (4,67 y 9,39 mg NP/mL), disminuye la viabilidad, aunque esta viabilidad no llega a valores inferiores al 40 %, ni para las concentraciones más elevadas. Sin embargo, el comportamiento de la composición con mayor cantidad de quitosano (C80/A20) es diferente, ya que elevadas concentraciones (a partir de 6,10 mg NP/mL) de nanopartículas sí llegan a producir un acusado descenso de la viabilidad, incluso inferior al 10 % en el caso de las concentración más elevada (12,12 mg NP/mL).



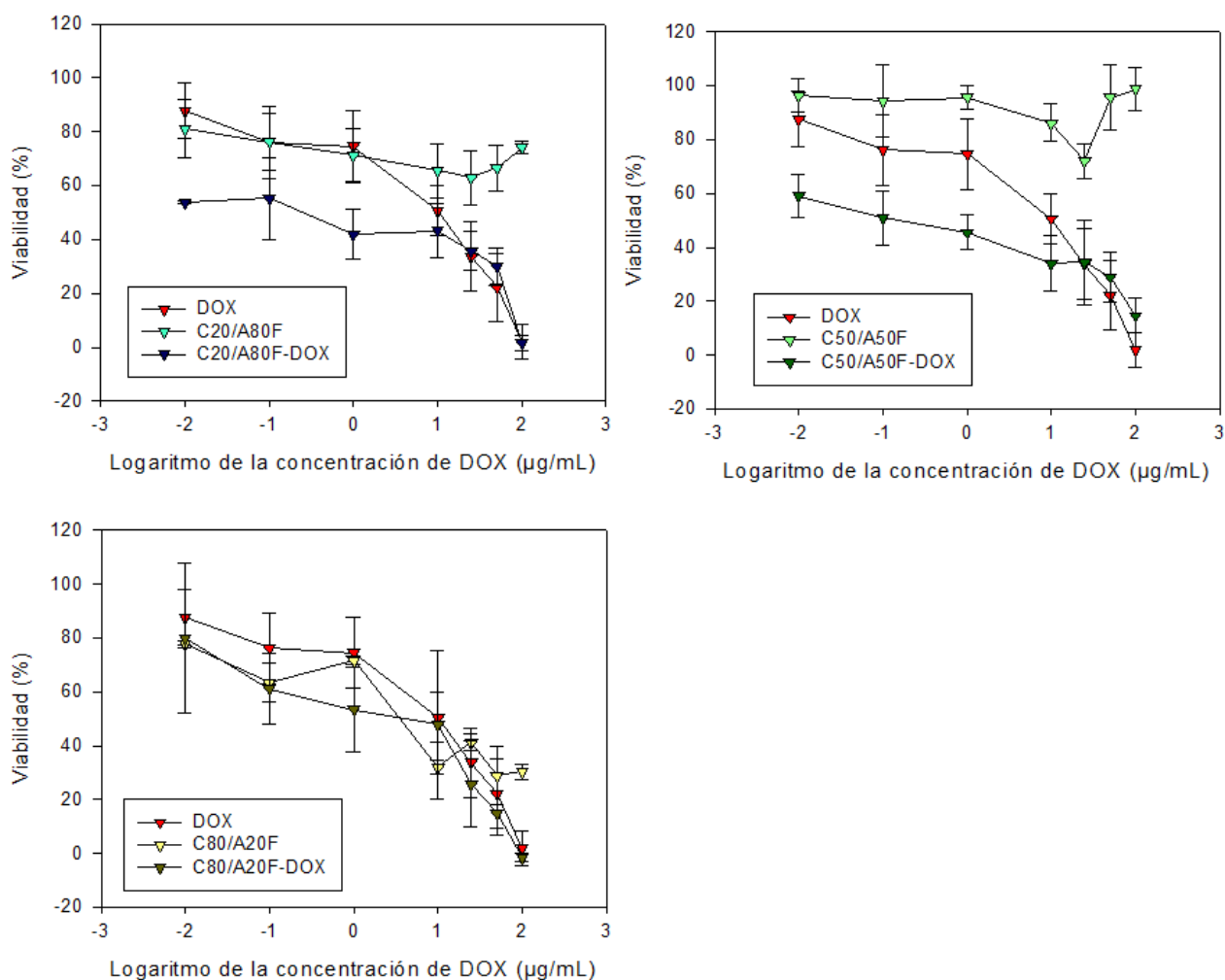
**Figura 33. Citotoxicidad en la línea celular HeLa de las nanopartículas blanco y con fármaco a rango de concentración equivalente a 0,01 y 100  $\mu\text{g/mL}$  de doxorrubicina de las composiciones C20/A80, C50/A50 y C80/A20**

La línea celular T47D (figura 34), presenta una tendencia similar a los casos anteriores, en el que las nanopartículas con fármaco incluido producen una muerte celular similar a la de la doxorrubicina libre, principalmente a las concentraciones más elevadas del estudio para las composiciones C50/A50 y C80/A20. Además, también en este caso la composición C20/A80, también aumenta la viabilidad celular a la concentración más elevada del estudio (19,23 mg NP/mL), mientras que la composición C80/A20 a las concentraciones de 6,10 mg NP/mL y 19,23 mg NP/mL producen un acusado descenso de la viabilidad similar al observado en la línea celular HeLa.



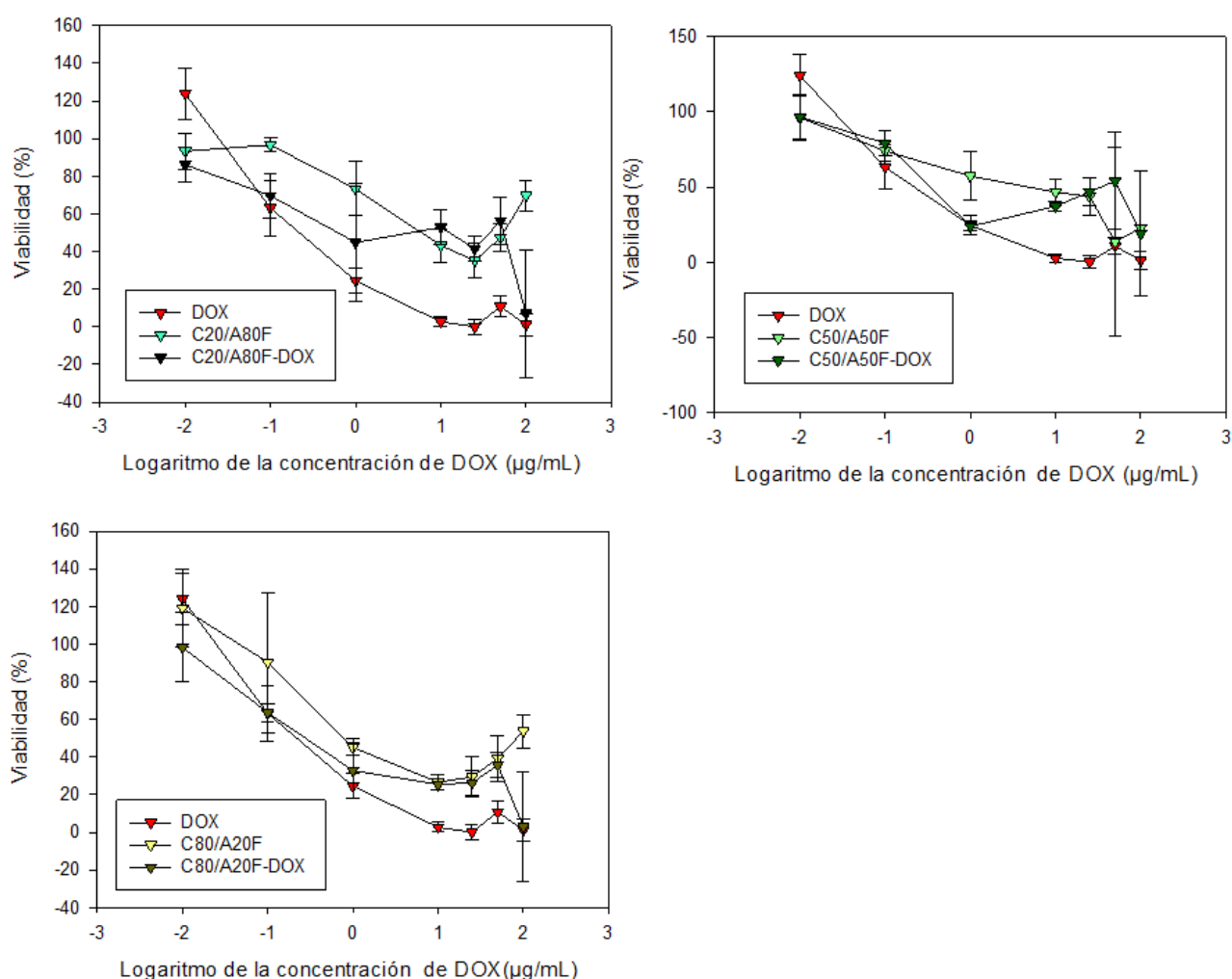
**Figura 34. Citotoxicidad en la línea celular T47D de las nanopartículas blanco y con fármaco a rango de concentración equivalente a 0,01 y 100 μg/mL de doxorrubicina de las composiciones C20/A80, C50/A50 y C80/A20**

El análisis de la viabilidad celular al utilizar las nanopartículas funcionalizadas con ácido fólico, muestra la misma tendencia que las nanopartículas sin funcionalizar para la línea celular MCF7 (figura 35). En la composición C20/A80F, C50/A50F y C80/A20F no se aprecian grandes diferencias con respecto a C20/A80, C50/A50 y C80/A20, disminuyendo la citocompatibilidad a elevadas concentraciones según se aumenta la proporción de quitosano. Es en los casos de las nanopartículas con el fármaco incluido en el que se observan diferencias entre las células funcionalizadas y sin funcionalizar. Las nanopartículas funcionalizadas con el fármaco incluido producen una mayor muerte celular que el fármaco en disolución a bajas concentraciones del mismo (entre 0,01 y 10  $\mu\text{g/mL}$ ).



**Figura 35. Citotoxicidad en la línea celular MCF7 de las nanopartículas blanco funcionalizadas y funcionalizadas con fármaco incluido a rango de concentración equivalente a 0,01 y 100  $\mu\text{g/mL}$  de doxorubicina de las composiciones C20/A80F, C50/A50F y C80/A20F**

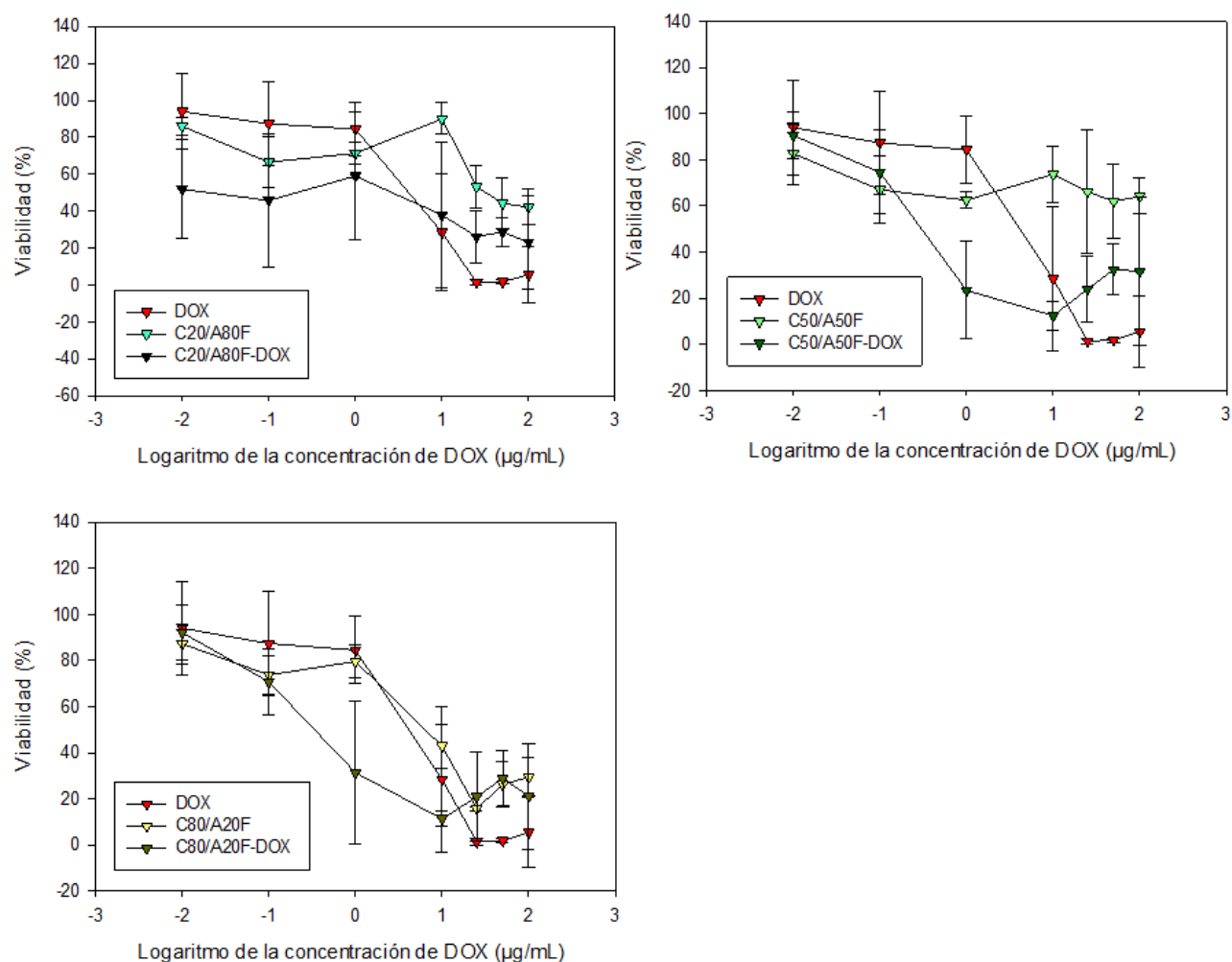
La figura 36 muestra los resultados en la línea celular HeLa de las nanopartículas funcionalizadas. Como puede observarse para estas nanopartículas sin fármaco, la viabilidad disminuye con respecto a sus homólogas sin funcionalizar. El descenso de la viabilidad de las nanopartículas con fármaco no llega a ser inferior al de la doxorrubicina en solución como sí ocurría en la línea celular MCF7.



**Figura 36. Citotoxicidad en la línea celular HeLa de las nanopartículas blanco funcionalizadas y funcionalizadas con fármaco incluido a rango de concentración equivalente a 0,01 y 100  $\mu\text{g/mL}$  de doxorrubicina de las composiciones C20/A80F, C50/A50F y C80/A20F**

Los resultados de viabilidad en la línea celular T47D para las nanopartículas funcionalizadas se muestran en la figura 37. En este caso, al igual que ocurría en la línea celular MCF7, se observan mayores descensos de la viabilidad para las nanopartículas funcionalizadas con fólculo que incorporan el fármaco que el fármaco libre.





**Figura 37. Citotoxicidad en la línea celular T47D de las nanopartículas blanco funcionalizadas y funcionalizadas con fármaco incluido a rango de concentración equivalente a 0,01 y 100  $\mu\text{g/mL}$  de doxorrubicina de las composiciones C20/A80F, C50/A50F y C80/A20F**

A partir de los resultados obtenidos, se pudieron determinar los valores de  $\text{IC}_{50}$  de las distintas composiciones que se recoge en la tabla 19. Como se observa, los valores de viabilidad no son función únicamente del fármaco encapsulado, sino que las diferentes composiciones de las nanopartículas afectan al descenso de la viabilidad. Al comparar todas las composiciones de los sistemas no funcionalizados, se observa cómo la composición con un  $\text{IC}_{50}$  menor, es decir, en la que se observa un descenso de la viabilidad del 50% con una concentración equivalente de doxorrubicina menor es con la composición C80/A20 en todas las líneas celulares. En el caso de las composiciones C20/A80 no es posible obtener el valor de  $\text{IC}_{50}$  dado que la viabilidad no llega a alcanzar valores inferiores al 50%. En el caso de la composición C50/A50 para la línea celular T47D tampoco es posible obtener un valor de  $\text{IC}_{50}$ , pero sí para las otras dos líneas celulares. Para la línea celular MCF7 este valor es el

equivalente a una concentración de 117,4 µg/mL de fármaco, concentración superior a la empleada en el estudio, mientras que para la línea celular HeLa la concentración equivalente es de 51,8 µg/mL.

**Tabla 19. Valores de IC<sub>50</sub> de cada tratamiento obtenido a partir de las gráficas de dosis-respuesta. El valor de IC<sub>50</sub> corresponde a la concentración equivalente de doxorrubicina encapsulada. Los casos en los que no aparece dato no son calculables al no alcanzar la máxima toxicidad**

Línea celular	Tratamiento	IC <sub>50</sub> (mg/mL)	Concentración equivalente de doxorrubicina (µg/mL)
MCF7	DOX	---	3,9
	C20/A80	C20/A80	---
		C20/A80F	---
		C20/A80-DOX	5,67
		C20/A80F-DOX	0,04
	C50/A50	C50/A50	10,97
		C50/A50F	---
		C50/A50-DOX	1,96
		C50/A50F-DOX	0,008
	C80/A20	C80/A20	4,79
		C80/A20F	0,58
		C80/A20-DOX	1,65
		C80/A20F-DOX	0,076
HeLa	DOX	---	2,4
	C20/A80	C20/A80	---
		C20/A80F	---
		C20/A80-DOX	0,36
		C20/A80F-DOX	0,094
	C50/A50	C50/A50	4,84
		C50/A50F	0,48
		C50/A50-DOX	0,24
		C50/A50F-DOX	---
	C80/A20	C80/A20	3,41
		C80/A20F	0,19
		C80/A20-DOX	1,52
		C80/A20F-DOX	0,05
T47D	DOX	---	2,98
	C20/A80	C20/A80	---
		C20/A80F	6,9
		C20/A80-DOX	0,51
		C20/A80F-DOX	0,003
	C50/A50	C50/A50	---
		C50/A50F	---
		C50/A50-DOX	0,25
		C50/A50F-DOX	0,038
	C80/A20	C80/A20	1,75
		C80/A20F	0,64
		C80/A20-DOX	0,59
		C80/A20F-DOX	0,05

Al comparar los datos de las partículas funcionalizadas con las nanopartículas blanco, los valores de IC<sub>50</sub> son menores que cuando no tienen ácido fólico en su composición, este

descenso de los valores es muy pronunciado en el caso de la línea celular HeLa en el que con una dosis muy baja de nanopartículas funcionalizadas, se consigue descender bruscamente la viabilidad celular.

## 6.2 Viabilidad a diferentes tiempos

Para saber cómo afecta una misma dosis de nanopartículas a lo largo del tiempo a las tres líneas celulares, se realizó un segundo ensayo de viabilidad, en el que se estudiaron los efectos citotóxicos de las nanopartículas sintetizadas y de la doxorubicina libre en las mismas líneas celulares a tres tiempos diferentes tras la adición de las nanopartículas (1, 3 y 6 días de tiempo de incubación). La concentración de nanopartículas y de fármaco elegida para este estudio fue la equivalente a una concentración de 1 µg/mL de doxorubicina libre, elegida a partir de las curvas dosis-respuesta, por tratarse de una concentración en la que los cambios de viabilidad son apreciables pero no llegan a causar un gran descenso de la viabilidad en el primer día como ocurre con concentraciones superiores de nanopartículas. La figura 38 muestra los resultados derivados de este estudio.

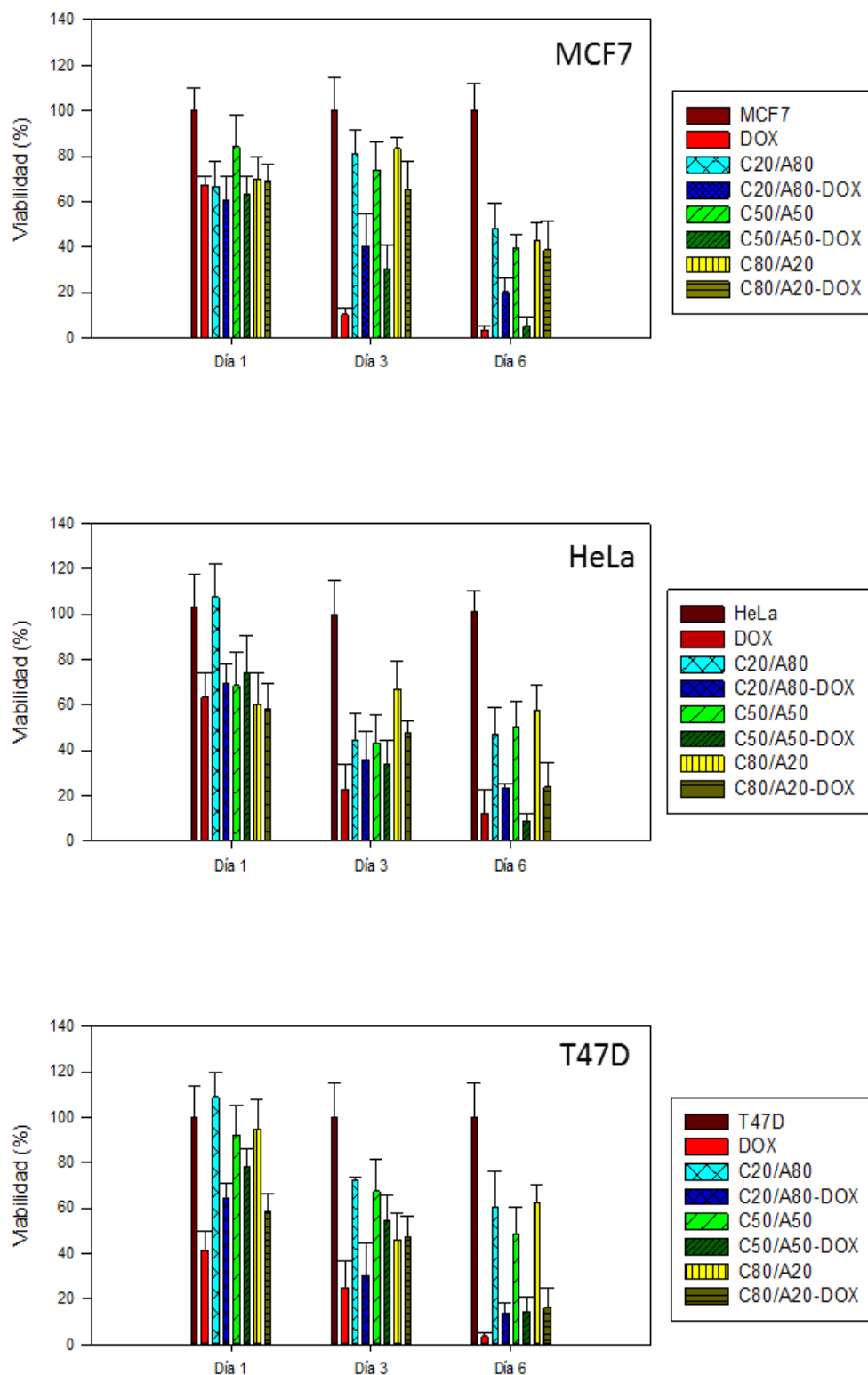
En el caso de la línea celular MCF7, en el día 1 no se observan diferencias entre la doxorubicina libre y las nanopartículas con fármaco incluido, además, en el caso de las composiciones C20/A80 y C80/A20 no se observan diferencias significativas entre las nanopartículas blanco y las nanopartículas cargas con fármaco. No así en el caso de la composición C50/A50 en la que se observa que la viabilidad de las nanopartículas blanco es mayor que las de las nanopartículas cargadas, llegando a no observarse diferencias significativas con las células empleadas como control.

En el día 3 de tratamiento, la viabilidad de las células tratadas con fármaco en disolución decrece drásticamente (inferior al 20 %), mientras que las nanopartículas cargadas con fármaco presentan una viabilidad superior al 20%. Al comparar los sistemas blanco con los cargados, se aprecian diferencias significativas en el caso de las nanopartículas C20/A80 y C50/A50 pero no en la composición C80/A20. Tras 6 días de tratamiento, no existen diferencias significativas entre las nanopartículas C50/A50-DOX y la doxorubicina libre, además de observarse una disminución de la viabilidad de la composición C20/A80.

Tras 6 días de tratamiento, no se observan diferencias significativas en la viabilidad de las composiciones C80/A20 y C80/A20-DOX. Para todos los sistemas blanco a este tiempo de incubación la viabilidad es superior al 40%.

En la línea celular HeLa, se observa un comportamiento similar a las MCF7 tras 24 horas de tratamiento, no hay diferencias significativas entre el fármaco en disolución y los sistemas blanco o cargados con fármaco excepto en el caso de las composición C50/A50 que no difiere significativamente con las células control. En esta línea celular, tras tres días de tratamiento, la viabilidad con el fármaco en disolución es mayor que en el caso de las MCF7, en este caso no se aprecian diferencias significativas entre los sistemas blanco y los sistemas cargados con doxorubicina. Tras 6 días de tratamiento, la viabilidad de las nanopartículas blanco es similar a la observada a los tres días de tratamiento (superior al 40%). Las nanopartículas con fármaco no presentan diferencias significativas con el fármaco en disolución.

En la línea celular T47D, al contrario de lo que ocurría en HeLa y MCF7, no se observan diferencias significativas en la viabilidad de las células tratadas con los sistemas blanco y la viabilidad de las células control. En este caso la viabilidad de las células tratadas con doxorubicina en solución es mucho menor que la de las nanopartículas cargadas con el fármaco. Además, se encuentran diferencias significativas entre C50/A50 y C50/A50-DOX y entre C80/A20 y C80/A20-DOX. En el tercer día de tratamiento, la viabilidad no desciende en ningún caso por debajo del 20%, encontrándose diferencias significativas únicamente entre C50/A50 y C50/A50-DOX. Tras seis días de tratamiento se observa, al igual que ocurría en las otras dos líneas celulares, que las nanopartículas blanco no llegan a provocar una disminución de la viabilidad inferior al 40%, mientras que las nanopartículas cargadas con fármaco tienen una viabilidad inferior al 20%.

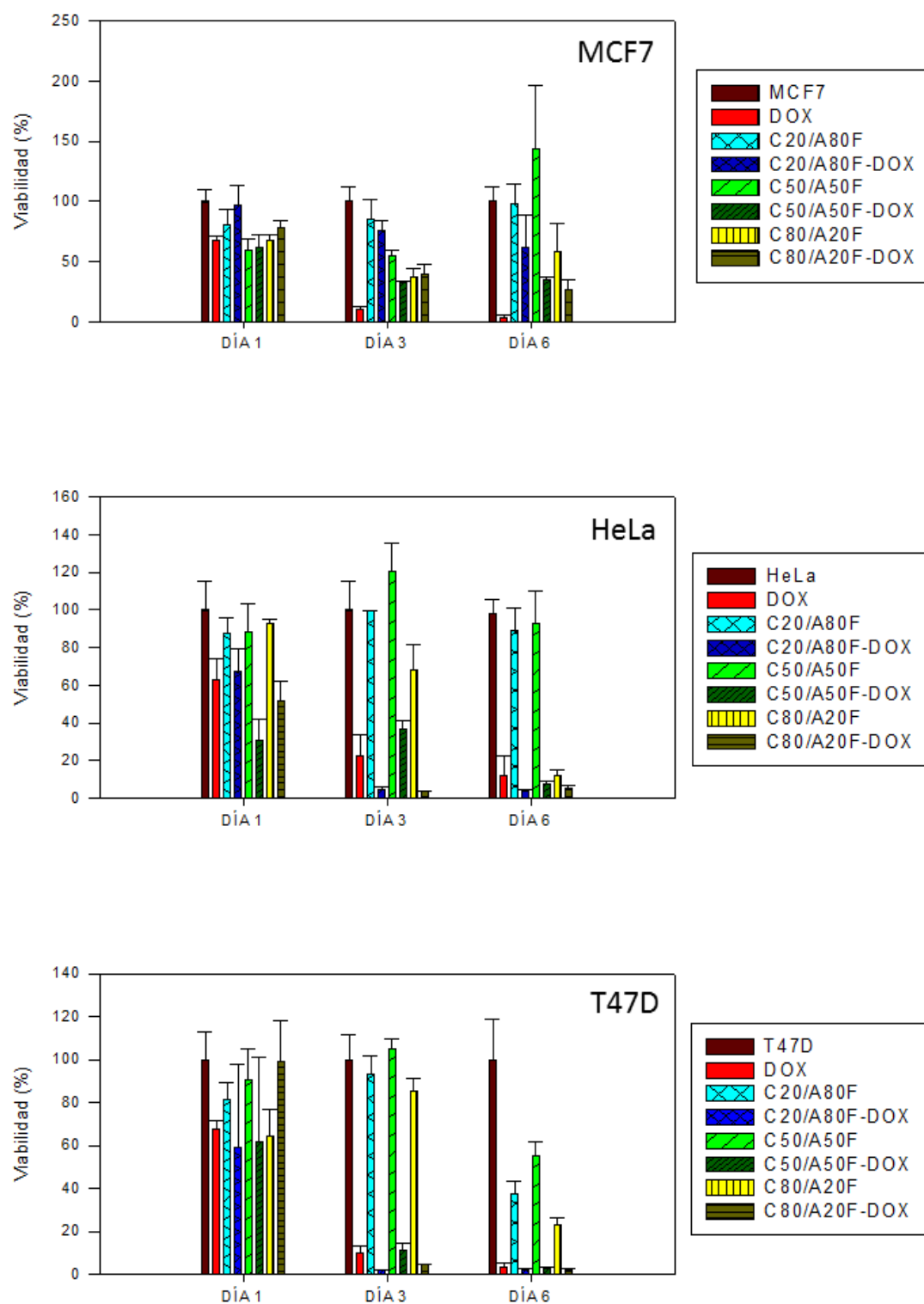


**Figura 38. Citotoxicidad de las nanopartículas blanco y con fármaco no funcionalizadas a una concentración equivalente a 1  $\mu\text{g/mL}$  de Doxorubicina (la concentración de nanopartículas está en concordancia con los datos expresados en la tabla 4)**

Se realizó el mismo estudio para las nanopartículas funcionalizadas con fólido, como se observa en la figura 39. Tras 24 horas de tratamiento apenas desciende la viabilidad. A la vez que no se aprecian diferencias significativas entre los sistemas blanco y los cargados con doxorubicina. Tras tres días de tratamiento, se produce un descenso de la viabilidad de las nanopartículas cargadas con doxorubicina sin diferencias significativas entre las diferentes composiciones. En el día 6, para todos los sistemas “blanco” la viabilidad celular es superior al 50%, la viabilidad de los sistemas cargados con doxorubicina es mayor que la de la doxorubicina en solución.

En el caso de las HeLa, se produce un gran descenso de la viabilidad tras 24 horas para la composición C20/A80F-DOX, sin embargo, en el tercer día de tratamiento la viabilidad de esta composición se mantiene en los mismos valores y son las composiciones C50/A50F-DOX y C80/A20F-DOX las que descienden la viabilidad celular hasta casi la muerte total. En el sexto día de tratamiento las nanopartículas funcionalizadas y cargadas con doxorubicina producen más muerte celular que la doxorubicina en solución, para este mismo tiempo, la composición C80/A20F también disminuye en gran medida (hasta un 20%) la viabilidad.

La línea celular T47D muestra a partir del tercer día de la incorporación de las nanopartículas un descenso de la viabilidad (inferior al 10%) de todos los sistemas cargados con fármaco. Aunque con las nanopartículas blanco no se llega a alcanzar una viabilidad inferior al 50% en ninguno de los casos, queda patente una tendencia en la que la composición C80/A20F produce mayor muerte celular que la composición C50/A50F y esta a su vez que la composición C20/A80F.

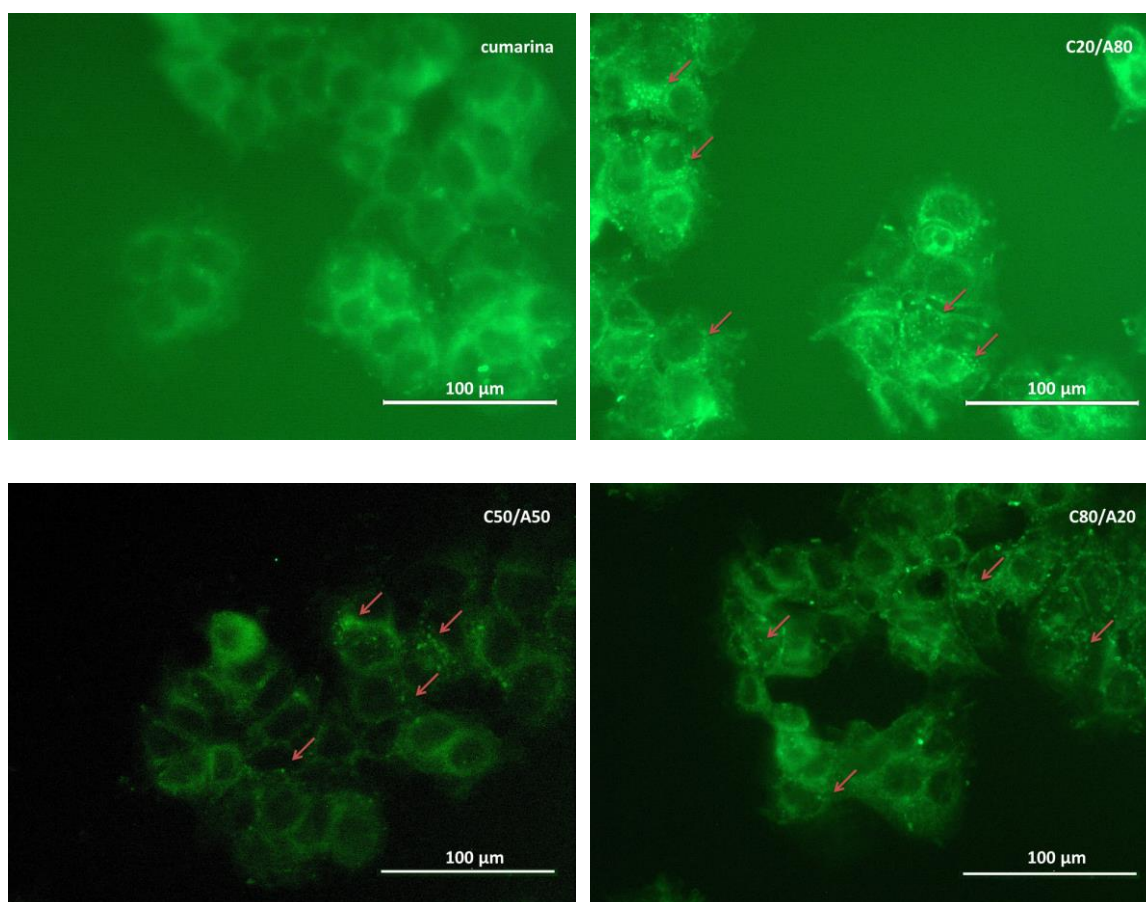


**Figura 39.** Citotoxicidad de las nanopartículas funcionalizadas y funcionalizadas con fármaco a una concentración equivalente a 1  $\mu\text{g/mL}$  de doxorubicina (tabla 5) a diferentes tiempos.

### 6.3 Estudios de incorporación de las nanopartículas

En los estudios de incorporación celular que se llevaron a cabo para asegurar que las nanopartículas afectan a las células gracias a que se introducen en las mismas se observa cómo tanto las nanopartículas blanco como las nanopartículas funcionalizadas con ácido fólico llegan a introducirse en el medio celular.

En la figura 40 se aprecia la incorporación de las nanopartículas sin fármaco en la línea celular MCF7. Para comprobar que la fluorescencia se debe a las nanopartículas, se empleó cumarina en disolución como control. En el caso de la cumarina se puede observar un color verde uniforme aunque con la presencia de pequeños cristales de cumarina. En el caso de las células tratadas con los sistemas (C20/A80, C50/A50 y C80/A20) se aprecian las nanopartículas, de tamaño inferior al de los cristales de cumarina y de aspecto más compacto. En todos los casos se observa la incorporación de los sistemas en el interior celular.

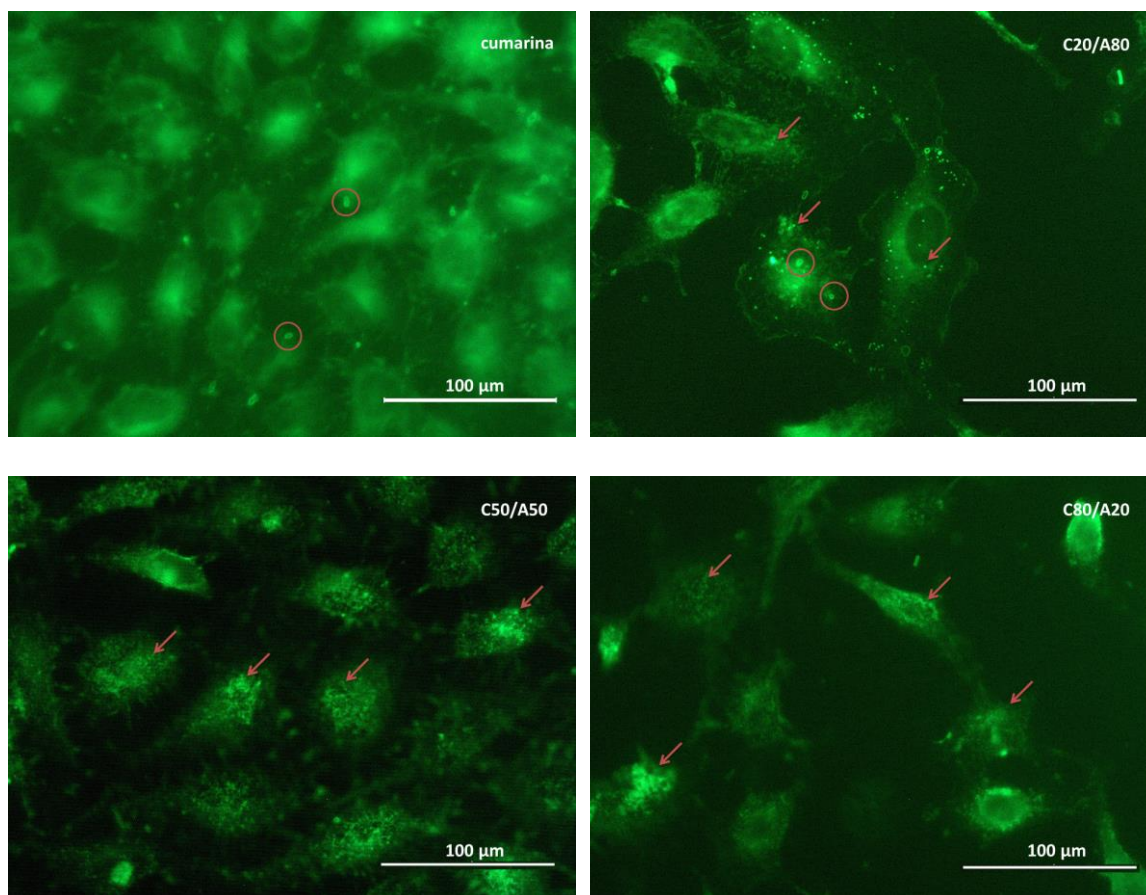


**Figura 40. Incorporación de las nanopartículas (C20/A80, C50/A50 y C80/A20) en la línea celular MCF7 a una concentración equivalente a 1 µg/mL de doxorrubicina, empleando cumarina como control. Las flechas rojas indican la posición de las nanopartículas**



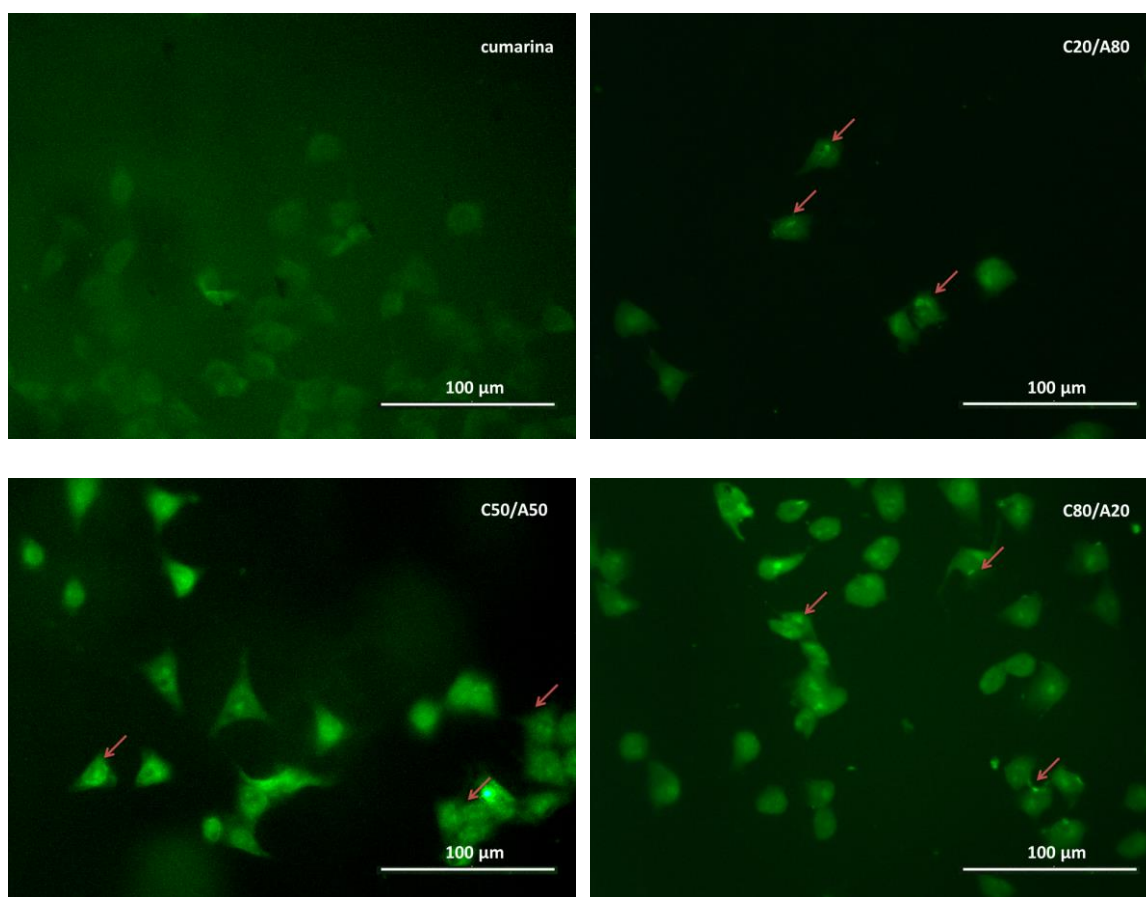
La figura 41, muestra los resultados obtenidos en la línea celular HeLa. Al igual que ocurría en la línea celular MCF7, existe presencia de cristales de cumarina (resaltados con un círculo rojo), sin embargo, también se observa la incorporación de nanopartículas en el interior celular.

Además, en todas las imágenes se puede observar la morfología característica de la línea celular.



**Figura 41. Incorporación de las nanopartículas (C20/A80, C50/A50 y C80/A20) en la línea celular HeLa a una concentración equivalente a 1  $\mu\text{g/mL}$  de doxorubicina, empleando cumarina como control. Las flechas rojas indican la posición de las nanopartículas y los círculos los cristales de cumarina**

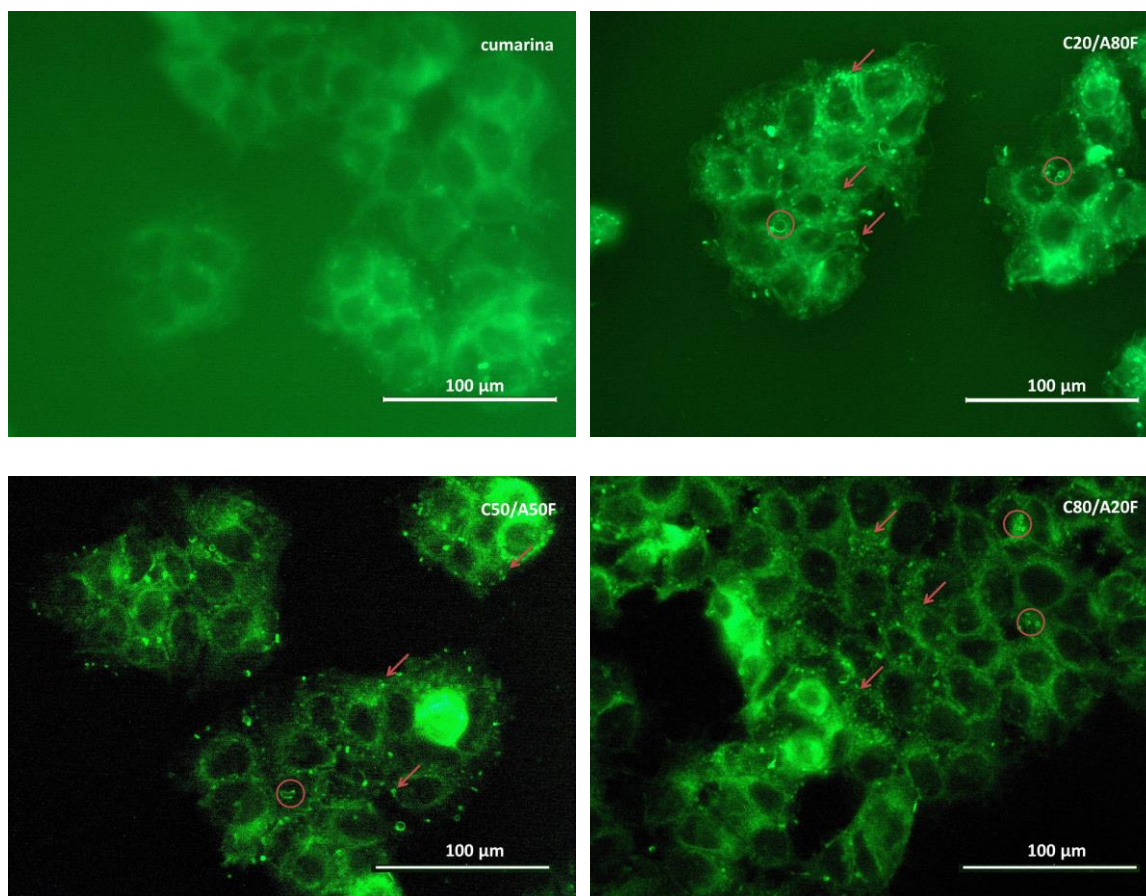
La línea celular T47D también mostró incorporación de las nanopartículas (figura 42). Al igual que en las otras líneas celulares se aprecia la diferencia entre las células control tratadas únicamente con cumarina en la que las células se tiñen uniformemente, y las células tratadas con los nanosistemas, en las que se puede apreciar la presencia de los mismos.



**Figura 42. Incorporación de las nanopartículas (C20/A80, C50/A50 y C80/A20) en la línea celular T47D a una concentración equivalente a 1 µg/mL de doxorrubicina, empleando cumarina como control. Las flechas rojas indican la posición de las nanopartículas**

En la figura 43, se muestra la línea celular MCF7 tratada con las nanopartículas funcionalizadas con ácido fólico. Al igual que ocurre con las nanopartículas no funcionalizadas, se observa la inclusión de las nanopartículas en el interior celular. De la misma manera se observa la diferencia entre las células tratadas únicamente con cumarina y las tratadas con los nanosistemas.

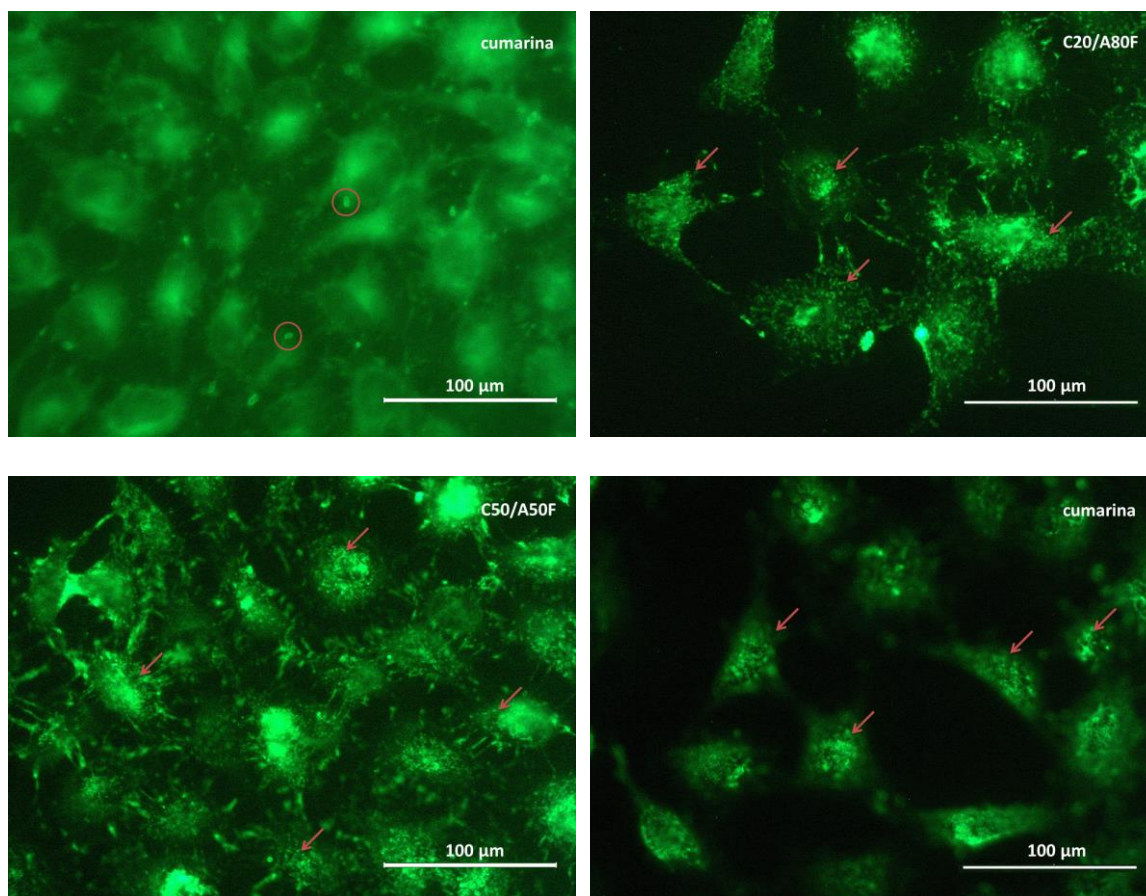
Además, no se observa una distribución celular diferente entre las células tratadas con los nanosistemas vectorizados con ácido fólico y las tratadas con las nanopartículas sin vectorizar. Mediante las imágenes no se puede hacer una valoración de la cantidad de nanopartículas que se encuentran en el interior celular; por tanto, no se puede asegurar una mejora en la internalización celular de las nanopartículas vectorizadas con ácido fólico. Para poder determinar la cantidad incluida se realizaron las medidas de fluorescencia expuestas posteriormente.



**Figura 43. Incorporación de las nanopartículas (C20/A80F, C50/A50F y C80/A20F) en la línea celular MCF7 a una concentración equivalente a 1  $\mu\text{g/mL}$  de doxorubicina, empleando cumarina como control. Las flechas rojas indican la posición de las nanopartículas y los círculos los cristales de cumarina**

La incorporación celular de las nanopartículas funcionalizadas en la línea celular HeLa se observa en la figura 44. De la misma forma que ocurría en el caso de las células MCF7, no se pueden determinar diferencias en la cantidad de nanopartículas incorporadas por acción del ligando respecto a las incorporadas por otros mecanismos, pero sí se puede asegurar una incorporación celular de todas las composiciones de nanopartículas.

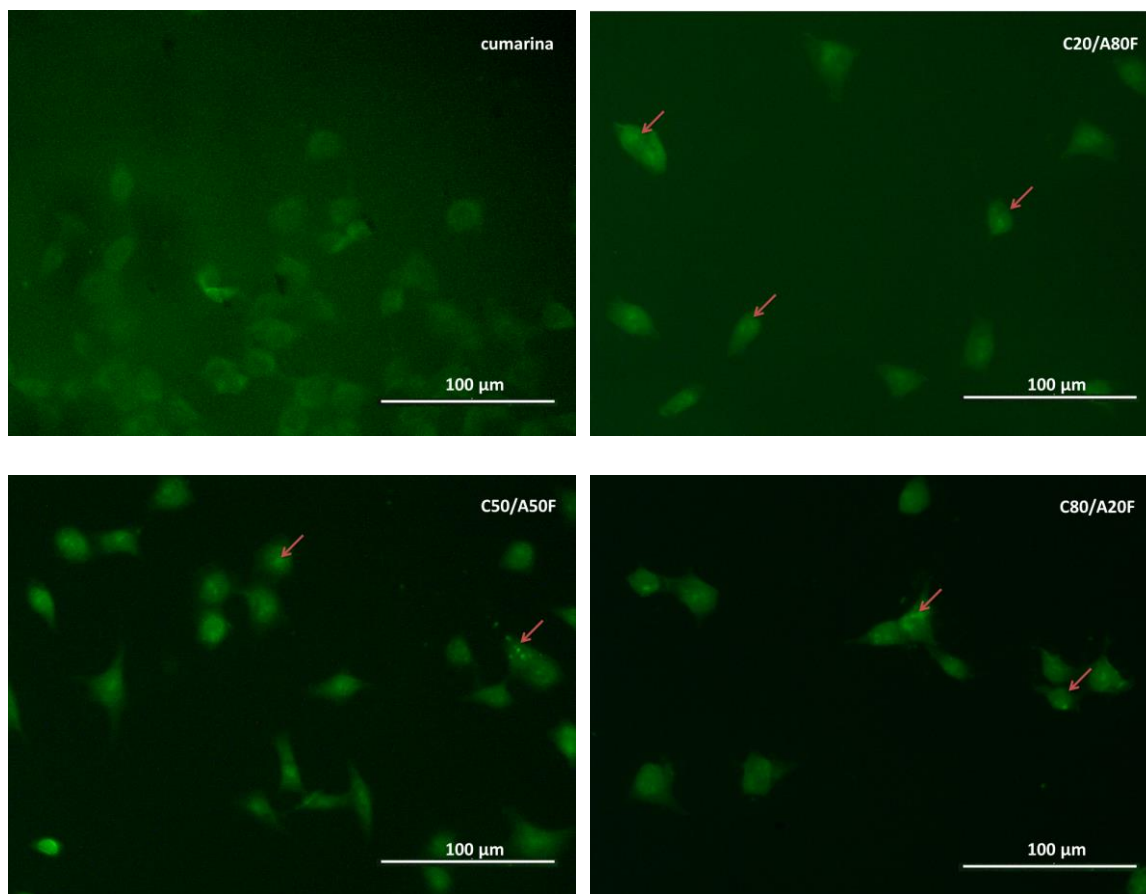




**Figura 44. Incorporación de las nanopartículas (C20/A80F, C50/A50F y C80/A20F) en la línea celular HeLa a una concentración equivalente a 1  $\mu\text{g/mL}$  de doxorrubicina, empleando cumarina como control. Las flechas rojas indican la posición de las nanopartículas y los círculos los cristales de cumarina**

En la figura 45 se muestran los resultados obtenidos para la incorporación de nanopartículas funcionalizadas con ácido fólico (C20/A80F, C50/A50F y C80/A20F) para la línea celular T47D.

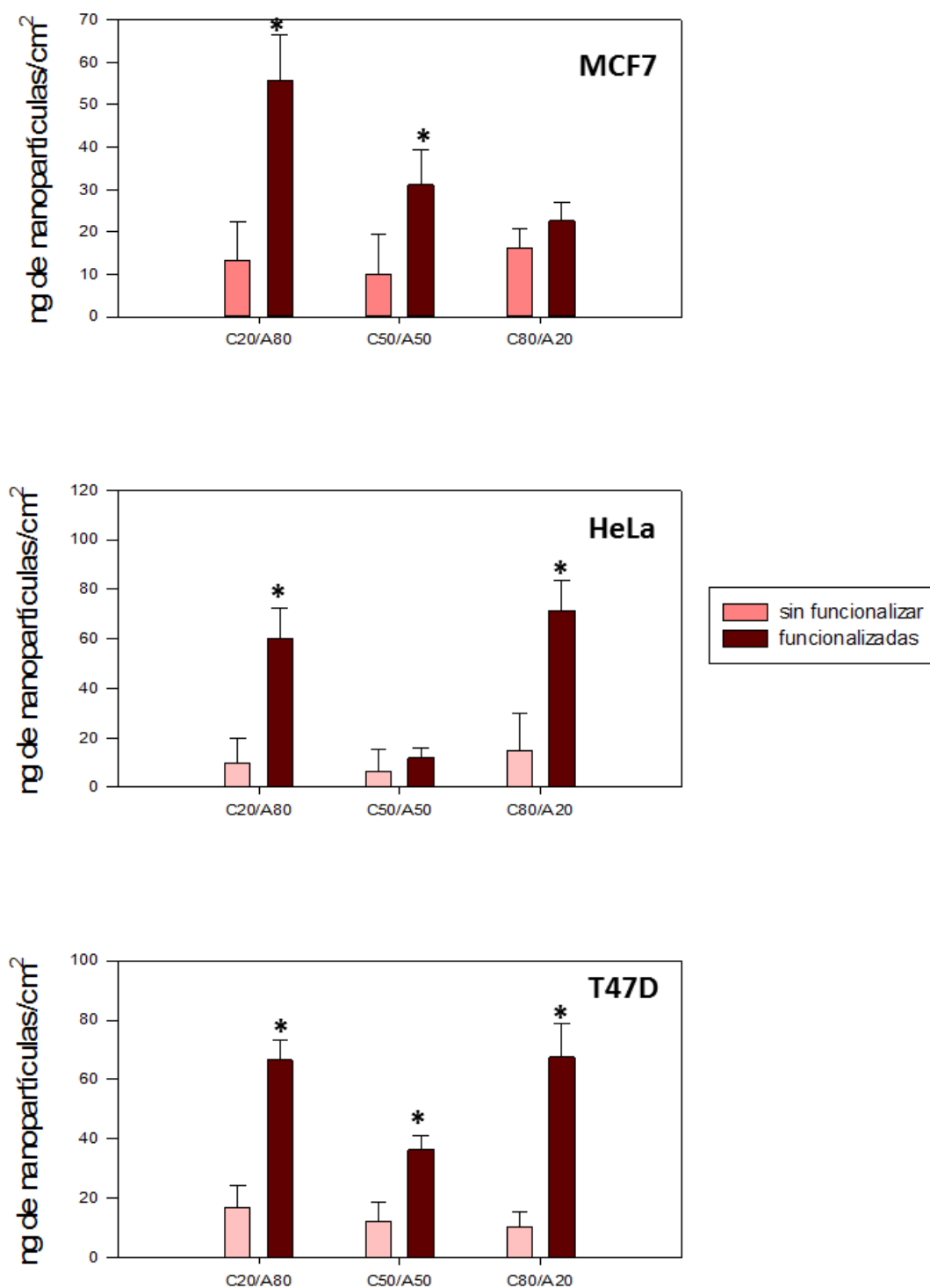
Siguiendo la misma tendencia que en los casos anteriores, se puede observar la incorporación celular de todas las composiciones de nanopartículas, así como la diferencia entre las células tratadas con cumarina y las células tratadas con nanopartículas.



**Figura 45. Incorporación de las nanopartículas (C20/A80F, C50/A50F y C80/A20F) en la línea celular T47D a una concentración equivalente a 1 µg/mL de doxorrubicina, empleando cumarina como control**

Como se ha explicado anteriormente, debido a la dificultad para establecer diferencias entre la incorporación de las nanopartículas funcionalizadas con ácido fólico y las nanopartículas sin funcionalizar, una vez que se aseguró la entrada de las nanopartículas al interior celular, se comprobó cuantitativamente cómo afectaba la presencia del ácido fólico en las estructuras a la internalización celular. En la figura 46, se muestran los resultados de cuantificación de la incorporación de las nanopartículas, tanto sin funcionalizar como funcionalizadas.

Si bien en casos puntuales no se aprecian diferencias significativas, en general se obtuvo una mayor incorporación de las nanopartículas mediante vehiculización activa.



**Figura 46.** Cuantificación de la incorporación celular de las nanopartículas de composiciones C20/A80, C50/A50 y C80/A20 funcionalizadas y sin funcionalizar con ácido fólico. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SD (n=5) Donde: \* indica diferencias significativas entre las nanopartículas funcionalizadas y sin funcionalizar.

### 6.3.1 Bloqueo receptores de folato

Tras comprobar que la funcionalización con ácido fólico facilitaba la internalización de las nanopartículas sintetizadas en las líneas tumorales analizadas, como se ha expuesto anteriormente, se llevó a cabo un estudio de internalización de las nanopartículas previo bloqueo de los receptores con ácido fólico. De esta manera se pretende conocer si el mecanismo de internalización de las nanopartículas funcionalizadas está relacionado con la sobreexpresión de los receptores de folato de las células tumorales.

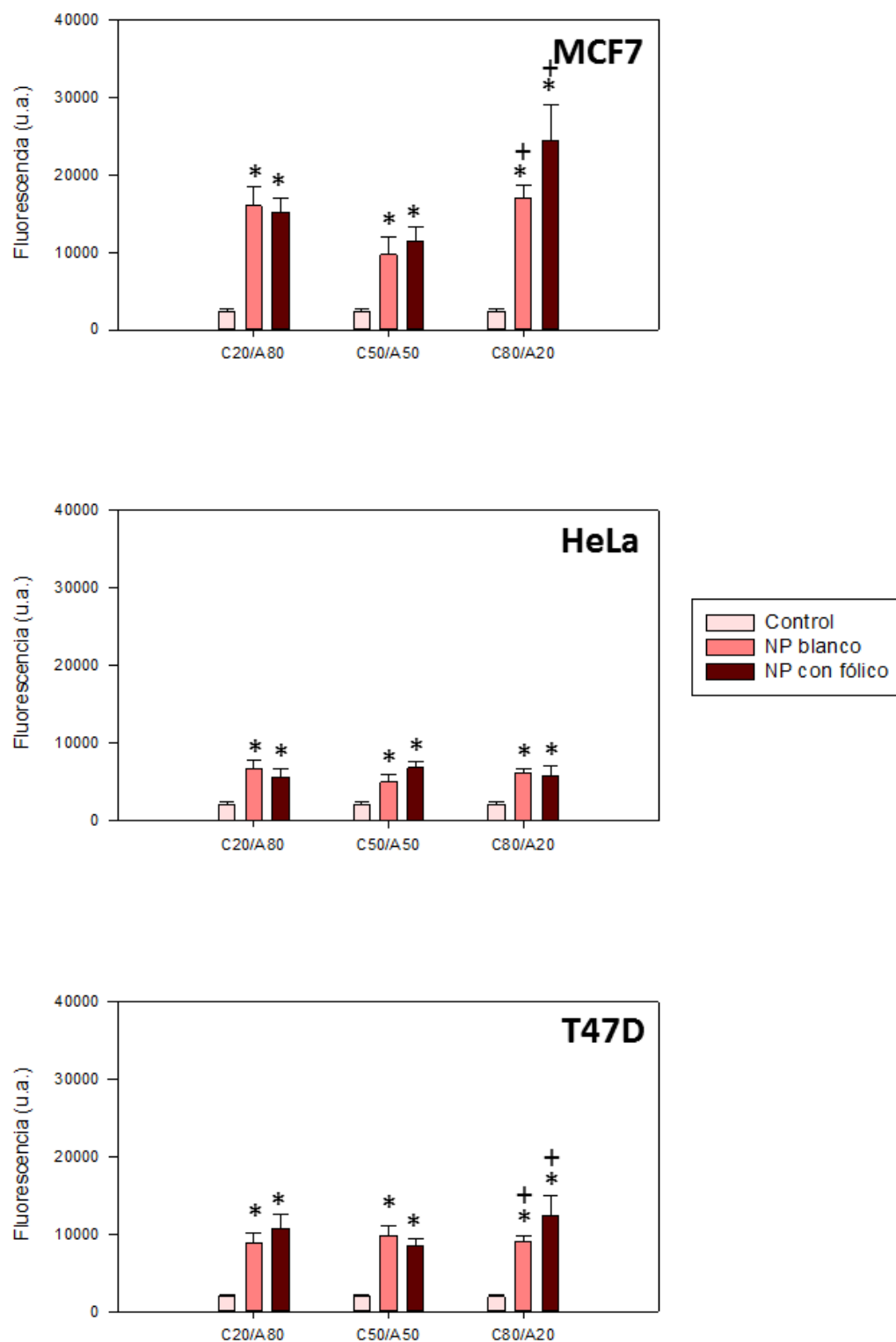
Los resultados obtenidos de este estudio aparecen en la tabla 20. En todos los casos se observó una disminución de la incorporación de las nanopartículas tras el bloqueo de los receptores de folato. De las tres composiciones de nanopartículas, fue en la composición C50/A50F en la que la disminución de incorporación de nanopartículas tras la incubación previa con ácido fólico fue menor.

**Tabla 20. Disminución de la incorporación, expresada en porcentaje, de las nanopartículas funcionalizadas con fólico previo bloqueo de los receptores de folato de la superficie celular de las líneas celulares: MCF7, HeLa y T47D**

COMPOSICIÓN NANOPARTÍCULAS	LÍNEA CELULAR		
	MCF7	HeLa	T47D
C20/A80F	63 %	55 %	72 %
C50/A50F	36 %	31 %	35 %
C80/A20F	82 %	63 %	79 %

### 6.4 Estudios estrés oxidativo en células

Con el fin de evaluar la posible producción de especies reactivas de oxígeno en las células como consecuencia de la incorporación de las nanopartículas en el interior celular, el siguiente paso consistió en la evaluación de ROS tras la incubación durante 1 hora con las nanopartículas a la misma concentración a la que se realizaron los estudios de incorporación celular (equivalente a 1 µg/mL de doxorrubicina) (figura 47).



**Figura 47. Formación de especies reactivas de oxígeno tras la inclusión de las nanopartículas durante una hora de incubación. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SD (n=5) \* Representa diferencias significativas respecto al grupo control y + diferencias significativas entre la misma composición funcionalizadas y sin funcionalizar**



De acuerdo con los resultados obtenidos en el estudio de especies reactivas de oxígeno (ROS), la incorporación de las nanopartículas a las células conlleva un incremento de la cantidad de ROS para todas las composiciones de nanopartículas comparadas con las células control. En el caso de la composición C80/A20, se observan diferencias significativas en la producción de ROS dependiendo de si las nanopartículas están o no funcionalizadas con ácido fólico en las líneas celulares MCF7 y T47D, siendo en ambos casos las nanopartículas con fólico en su composición las que desencadenan una mayor producción de especies reactivas de oxígeno.

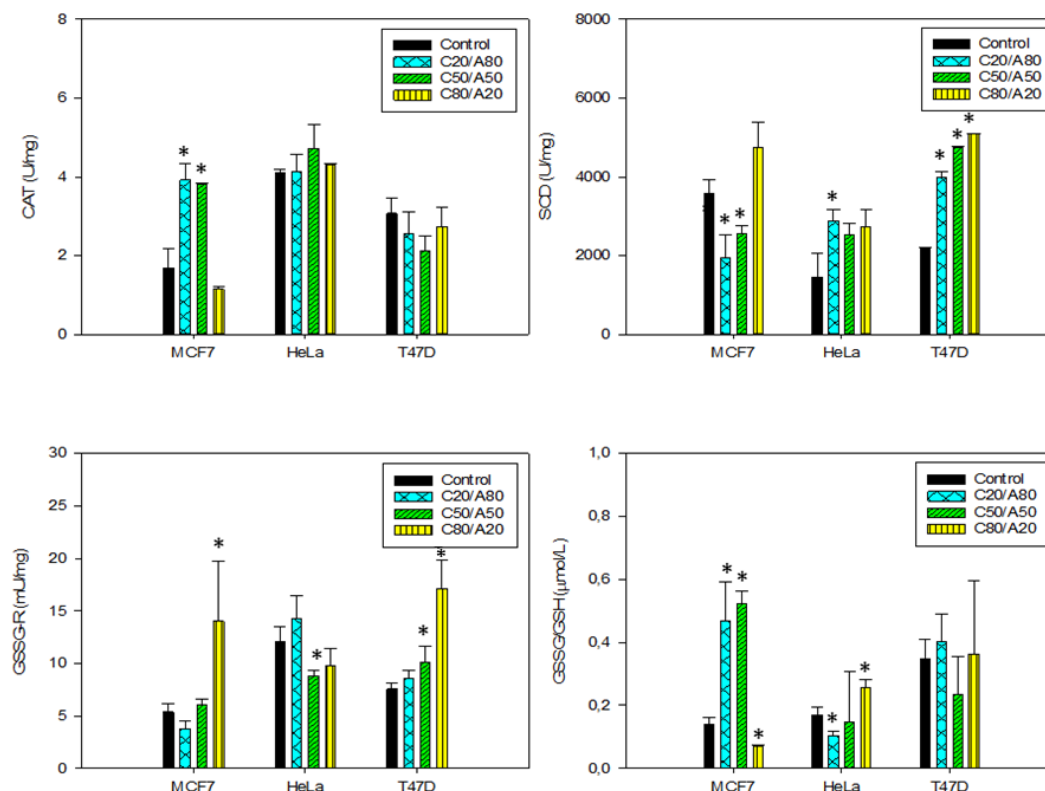
### **6.5 Estudios estrés oxidativo en células**

Tras el análisis de especies reactivas de oxígeno producidas al incorporarse las nanopartículas en las células, se determinó la actividad enzimática relacionada con la protección frente al estrés oxidativo como son la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), la glutathione reductasa (GR) y la molécula de glutathione total (GSSG/GSH). Este estudio se realizó tras la incorporación de las nanopartículas funcionalizadas y de las nanopartículas sin funcionalizar.

Como se puede observar en la imagen (figura 48), la línea celular MCF7 aumenta su producción de catalasa en el caso del tratamiento con las composiciones C20/A80 y C50/A50 teniendo valores disminuidos de la enzima superóxido dismutasa para las mismas composiciones. Además, estas composiciones producen un aumento del glutathione total. Sin embargo, es la composición C80/A20 la que produce un incremento de la actividad de la enzima glutathione reductasa.

En el caso de la línea celular HeLa, la actividad de la enzima catalasa no se ve afectada por ninguna de las composiciones. La composición C20/A80 produce un aumento de la superóxido dismutasa (SOD) además de afectar a los niveles de glutathione total. Las composiciones C20/A80 y C80/A20 no modifican a la actividad de la glutathione reductasa pero sí afectan a los valores de glutathione total. En el caso de la composición C50/A50 sí se observa una disminución de la glutathione reductasa.

En la línea celular T47D, se vieron afectados los valores tanto de la superóxido dismutasa como de la glutathione reductasa. En el caso de la SOD su actividad se aumentó para todas las composiciones de nanopartículas mientras que en el caso de la glutathione reductasa, sólo se vio significativamente aumentada para la composición C80/A20.



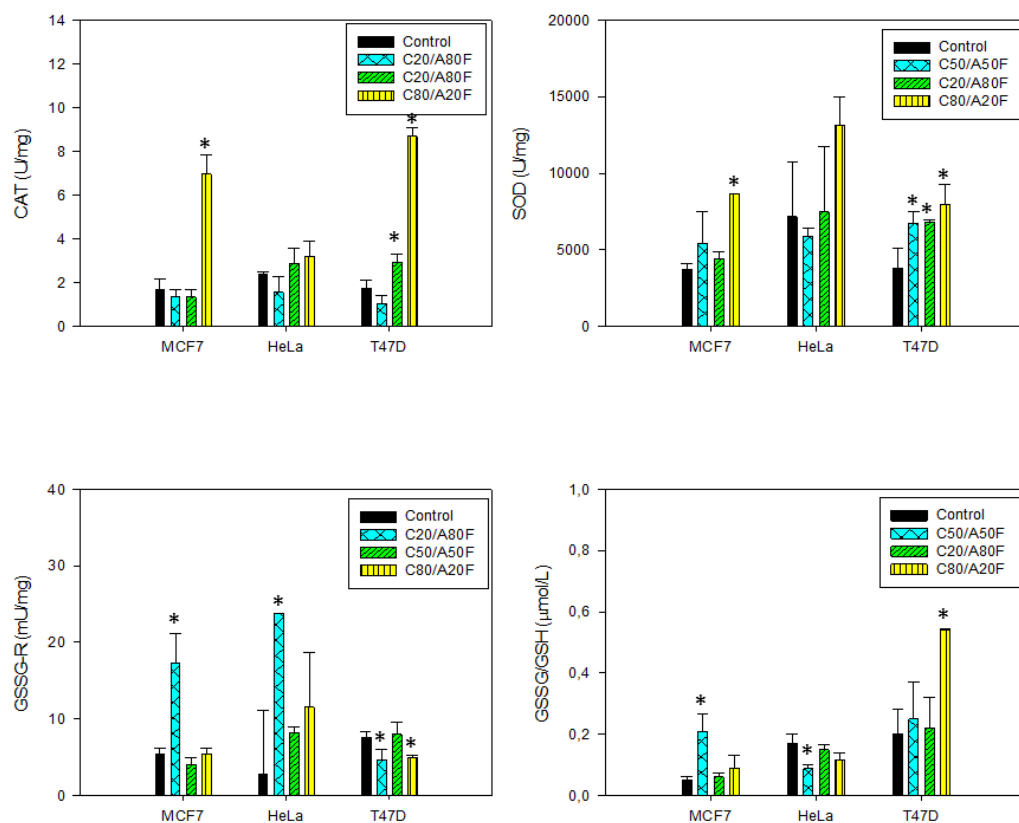
**Figura 48. Defensas antioxidantes (catalasa, superóxido dismutasa, glutatión reductasa y glutatión total) en las líneas celulares MCF7, HeLa y T47D tras el tratamiento con las nanopartículas blanco no funcionalizadas. Todos los resultados se expresan como media  $\pm$  SD (n=4). \* Diferencias significativas respecto al grupo control**

En el caso de las enzimas antioxidantes celulares tras ser incorporadas las nanopartículas blanco funcionalizadas (figura 49), se observa que los cambios que producen no afectan en el mismo sentido a las enzimas como lo hacían sus homólogos.

En el caso de la línea celular MCF7, sus defensas antioxidantes no se ven afectadas por la composición C50/A50F como sí lo hacían con la composición C50/A50. En este caso, la composición C80/A20F produce un incremento tanto de la actividad enzimática de la catalasa como de la superóxido dismutasa.

Por otro lado, tras incorporar las distintas nanopartículas funcionalizadas. Se observó un aumento de la actividad enzimática de la glutatión reductasa y una disminución del glutatión total para la composición C20/A80F.

La línea celular T47D mostró una menor afectación de la superóxido dismutasa, pero en este caso sí se vio afectada la actividad de la catalasa (C50/A50F y C80/A20F).

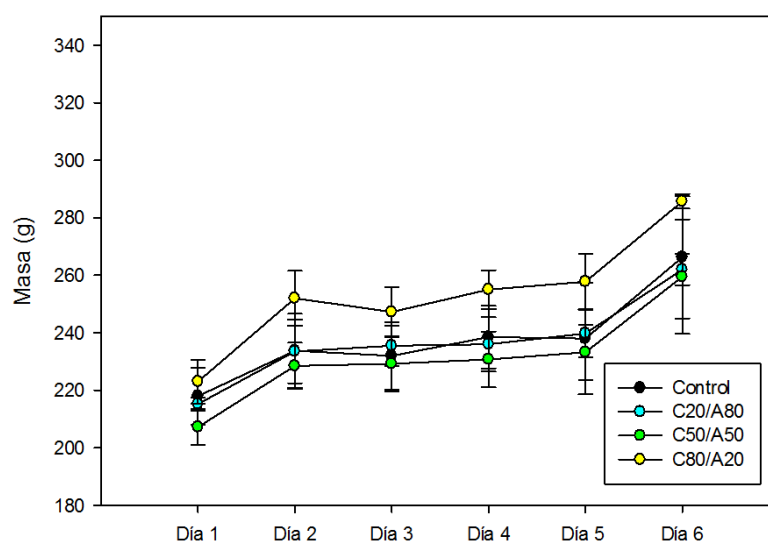


**Figura 49. Defensas antioxidantes (catalasa, superóxido dismutasa, glutathion reductasa y glutathion total) en las líneas celulares MCF7, HeLa y T47D tras el tratamiento con las nanopartículas blanco funcionalizadas. Todos los resultados se expresan como media  $\pm$  SD (n=4). \* Diferencias significativas respecto al grupo control**

## 7. ESTUDIOS DE BIOCOMPATIBILIDAD

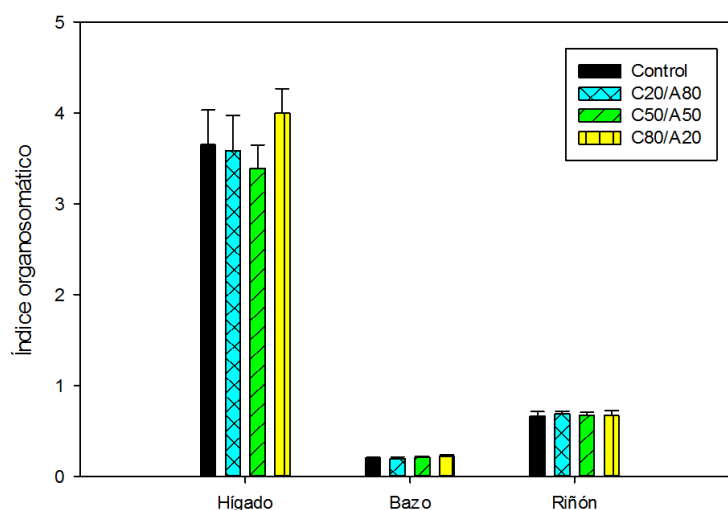
### 7.1 Índice organosomático

Para comprobar cómo afectan los sistemas una vez incorporados en el organismo, se realizaron estudios de biocompatibilidad con ratas *Wistar* hembras como se especifica en el apartado de materiales y métodos. Durante estos estudios se realizaron controles periódicos del peso de cada animal, para comprobar un correcto crecimiento y un buen estado general de salud de los animales. Con estos controles se comprobó que se producía un incremento normal del peso de los animales que no se vio afectado por la inyección de las nanopartículas ni por los sucesivos análisis de sangre (figura 50).



**Figura 50. Incremento de la masa de las ratas Wistar hembra durante los estudios de biocompatibilidad con los sistemas blanco. En todos los resultados media  $\pm$  SD (n=4)**

Al finalizar los estudios de biocompatibilidad, se sacrificaron los animales y se obtuvo el índice organosomático de hígado, riñón y bazo, ya que ciertas enfermedades o daños en estos tejidos conllevan un decrecimiento o aumento considerable bien por atrofia o por exceso de actividad (figura 51). Como se puede comprobar en la figura, los índices organosomáticos de los animales con tratamiento no difieren de los animales empleados como control.



**Figura 51. Índice organosomático de las ratas Wistar hembra tras los estudios de biocompatibilidad con los sistemas blanco. En todos los resultados se expresan como la media  $\pm$  SD (n=4)**

## 7.2 Estudios hematológicos y de coagulación

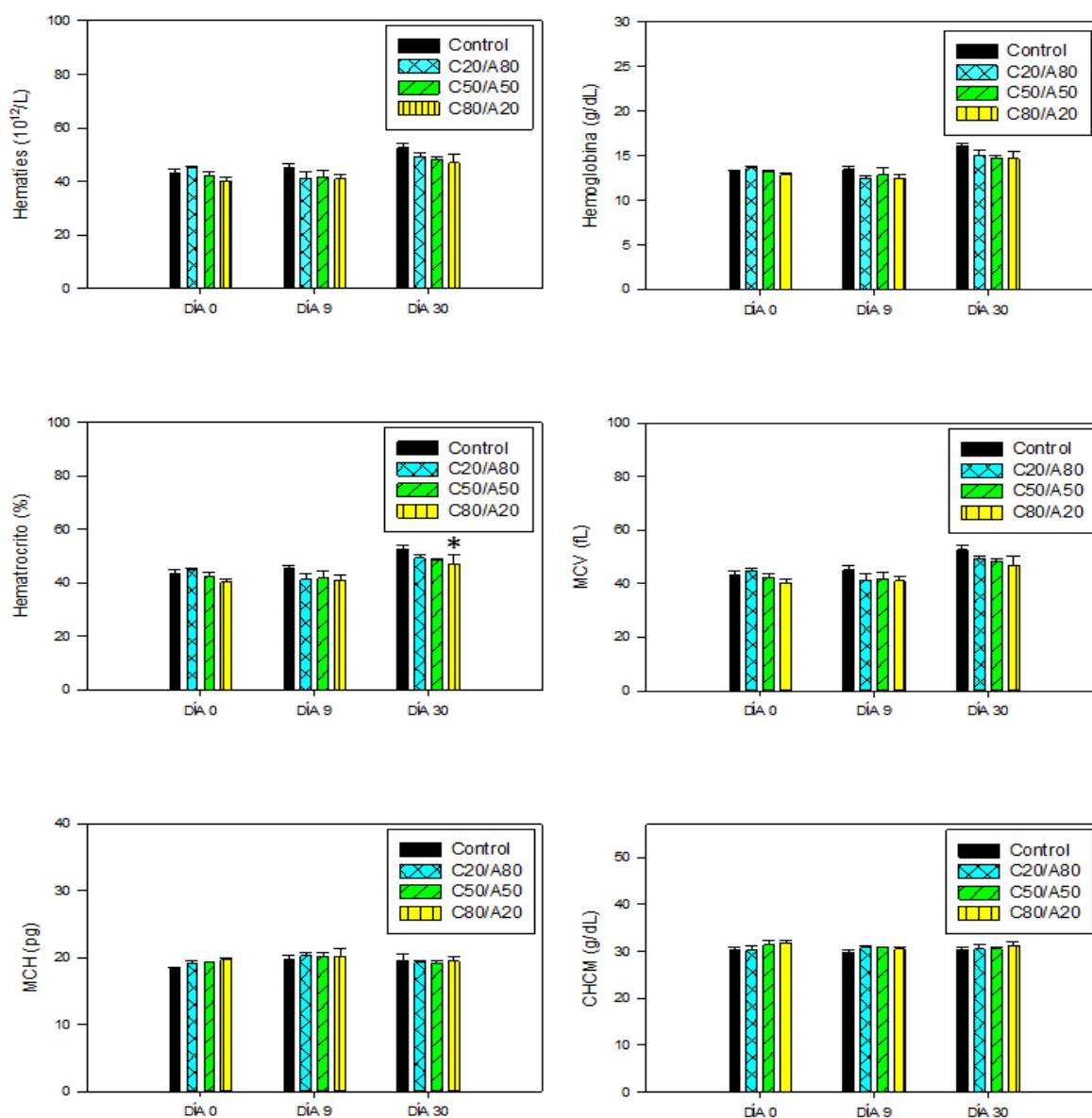
El hecho de que los sistemas se distribuyan a través del sistema sanguíneo, se administraron mediante punción en la vena de la cola, hace que sea posible la alteración de los parámetros hematológicos y de coagulación, por lo que se determinaron estos parámetros para comprobar si se ven afectados por la administración de los sistemas.

### 7.2.1 Estudios hematológicos

La sangre tiene como principal función mantener un vínculo entre los distintos órganos y células del organismo, facilitando la llegada de nutrientes y la salida de compuestos de secreción. Para ello está compuesta por plasma sanguíneo en el que se encuentran suspendidas dos líneas celulares distintas, la línea celular roja y la línea celular blanca, y las plaquetas.

Para comprobar cómo se veían afectadas estas líneas celulares tras la administración de los sistemas, se realizaron estudios hematológicos en los que se evaluaron las dos líneas celulares roja y blanca y parámetros derivados de las mismas. Los parámetros cuantificados fueron: hematíes, hematocrito, hemoglobina, hemoglobina corpuscular media (MCH), la concentración media de hemoglobina corpuscular (CHCM), el volumen corpuscular medio (VCM), la plaquetas, los leucocitos y los linfocitos. Los valores obtenidos de este análisis aparecen en la figura 52.

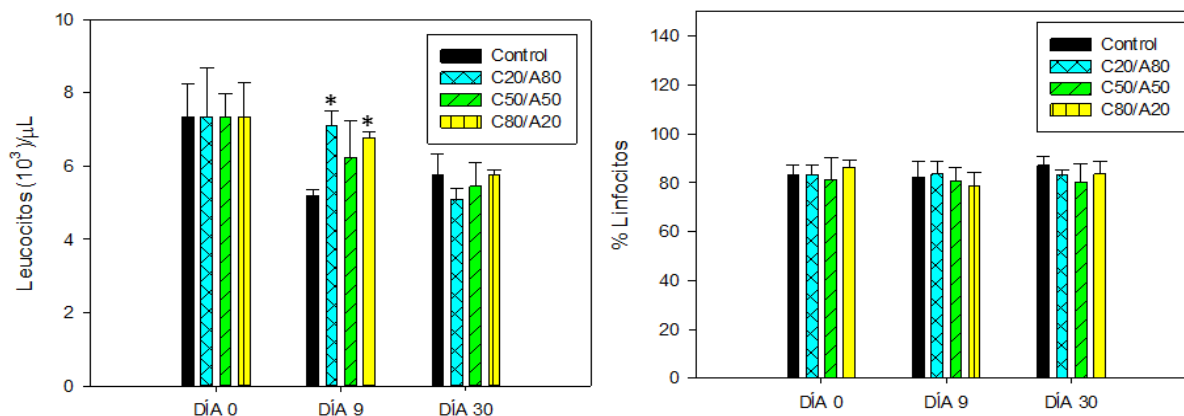
De acuerdo con la figura, los resultados obtenidos para los marcadores como los hematíes, la hemoglobina y los parámetros hematológicos relacionados (volumen corpuscular medio, la hemoglobina corpuscular media y la concentración media de hemoglobina corpuscular) no mostraron diferencias significativas con respecto al grupo control. En el caso del hematocrito se observaron diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) en el día 30 para la composición C80/A20 en el que el valor del hematocrito descendió con respecto al valor del grupo control.



**Figura 52. Parámetros hematológicos de la línea roja medidos a tres tiempos diferentes (0, 9 y 30 días) después de la administración de las partículas. Todos los resultados se expresan como media  $\pm$  SD (n=4). \* Diferencias significativas con el grupo control**

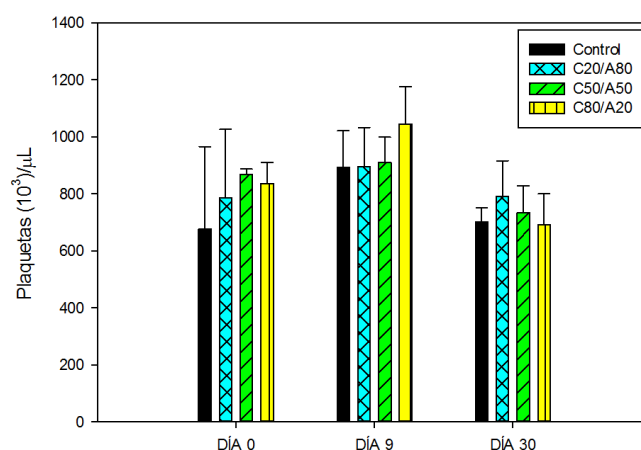
Los valores correspondientes a la línea celular blanca (figura 53) mostraron un aumento significativo ( $p \leq 0,05$ ) de las células blancas con respecto al grupo control el día 9 de tratamiento tras la inyección de los sistemas C20/A80 y C80/A20. Este aumento de la

respuesta inmune no se observe a los 30 días de tratamiento, día en el que no hay diferencias significativas entre las ratas a las que se les administraron los sistemas y el grupo control.



**Figura 53. Parámetros hematológicos de la línea blanca medidos a tres tiempos diferentes (0, 9 y 30 días) después de la administración de las partículas. Todos los resultados se expresan como media  $\pm$  SD (n=4). \* Diferencias significativas con el grupo control**

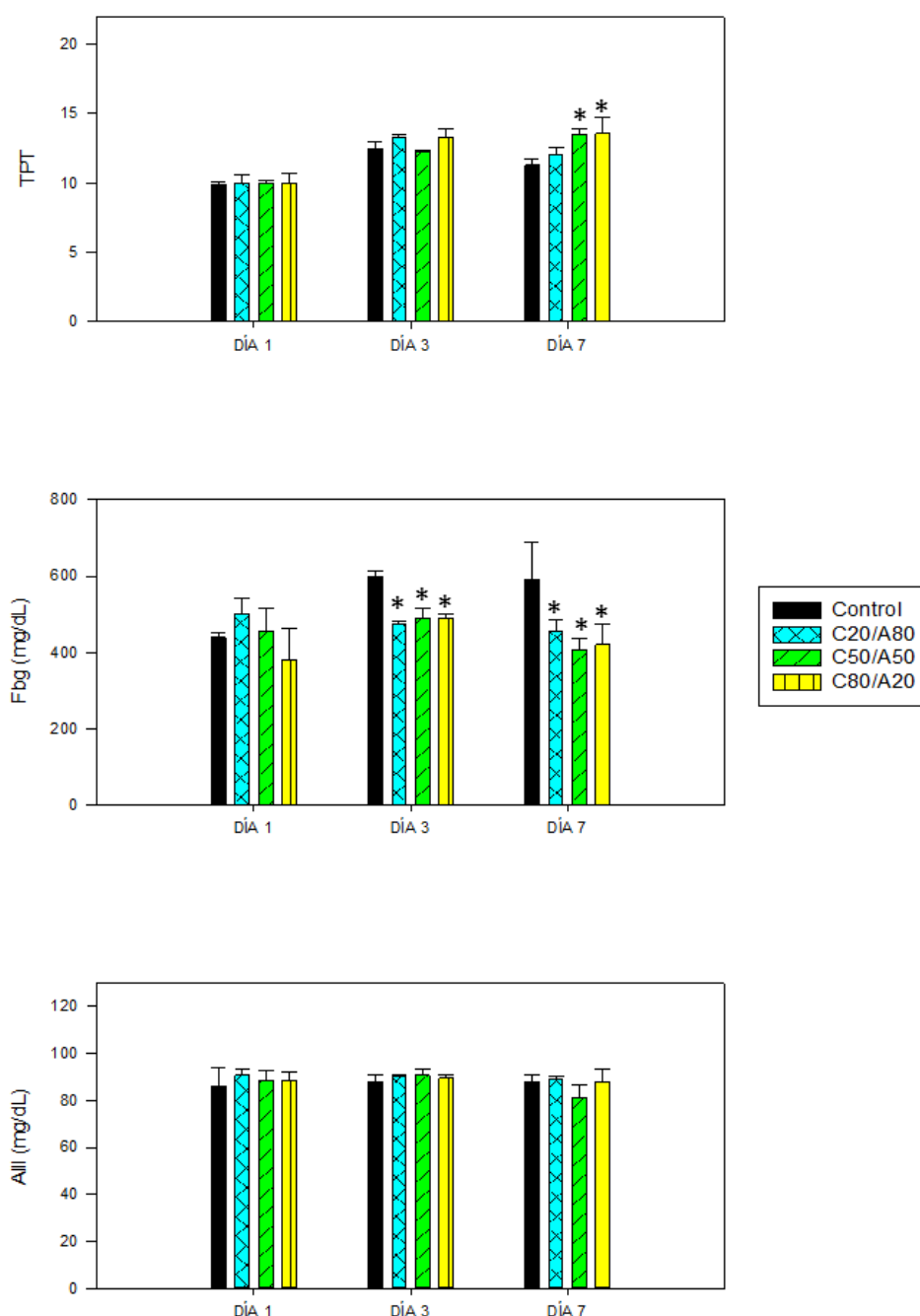
También se puede observar que ningún tratamiento produjo cambios en el caso de las plaquetas (figura 54) con respecto al grupo control en ninguno de los días de tratamiento.



**Figura 54. Parámetros hematológicos (plaquetas) medidos a tres tiempos diferentes (0, 9 y 30 días) después de la administración de las partículas. Todos los resultados se expresan como media  $\pm$  SD (n=4). \* Diferencias significativas con el grupo control**

### 7.2.2 Estudios de coagulación

Para saber si las nanopartículas eran capaces de afectar a la cascada de la coagulación, se midieron distintos parámetros involucrados en este proceso como son la antitrombina III (AIII), el fibrinógeno (Fbg) y el tiempo de protrombina (TPT) (figura 55).



**Figura 55. Factores de coagulación medidos a tres tiempos diferentes (1, 3 y 7) después de la administración de las nanopartículas. Todos los resultados se expresan como media  $\pm$  SD (n=4). \* Diferencias significativas con respecto al grupo control**



Como se aprecia en la figura, la antitrombina III no se vio afectada por la administración de las nanopartículas. En el caso de la protrombina sí que se vieron alterados los valores una semana después de la administración de las nanopartículas para la composición C80/A20. El factor de coagulación que presentó mayores cambios por la administración de los sistemas, fue el fibrinógeno. Tanto en el tercer día tras la administración como siete días después, los valores de fibrinógeno se vieron afectados por la inclusión de las tres composiciones de nanopartículas, en todos los casos los valores de fibrinógeno disminuyeron con respecto a los del grupo control.

### 7.3 Estudios bioquímicos en plasma

Los principales órganos depuradores del organismo al administrar un fármaco y, por tanto, los que se pueden ver más afectados, son el hígado y los riñones. Para saber si las nanopartículas han causado daño a alguno de estos órganos se midieron los parámetros bioquímicos relacionados con posibles alteraciones renales, nitrógeno úrico en sangre (BUN) y creatinina (CRE), y hepáticas como la alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST) y fosfatasa alcalina (ALP). Los valores obtenidos de estos estudios se presentan en las tablas 21, 22 y 23.

Como puede observarse en la tabla 21, todas las composiciones presentan valores significativamente inferiores en los niveles de AST con respecto al control 24 horas después de haber iniciado el tratamiento, sin embargo, se ve cómo en los días sucesivos estos niveles llegan a ser equiparables con el control.

**Tabla 21. Marcadores bioquímicos en plasma. Medidas de AST en plasma sanguíneo de las ratas tratado con heparina a tres tiempos diferentes (0, 21 y 30 días) tras la administración de los nanosistemas. Todos los datos se presentan como media  $\pm$  SD (n=4). Donde \* diferencias significativas respecto al grupo control**

	AST (U/L)		
	DÍA 1	DÍA 21	DÍA 30
<b>CONTROL</b>	173,3 $\pm$ 4,7	73,3 $\pm$ 9,8	75,0 $\pm$ 6,4
<b>C20/A80</b>	95,8 $\pm$ 18,5*	63,3 $\pm$ 10,0	73,3 $\pm$ 6,1
<b>C50/A50</b>	120,0 $\pm$ 9,4*	78,9 $\pm$ 8,4	80,0 $\pm$ 5,8
<b>C80/A20</b>	91,7 $\pm$ 11,8*	65 $\pm$ 11,7	59,2 $\pm$ 5,0

El marcador bioquímico ALT no difiere significativamente con respecto al grupo control en ninguno de los casos (tabla 22).

**Tabla 22. Marcadores bioquímicos en plasma. Medidas de ALT y ALP en plasma sanguíneo de las ratas tratado con heparina a tres tiempos diferentes (0, 21 y 30 días) tras la administración de los nanosistemas. Todos los datos se presentan como media  $\pm$  SD (n=4). Donde \* diferencias significativas respecto al grupo control**

	ALT (U/L)		
	DÍA 1	DÍA 21	DÍA 30
<b>CONTROL</b>	35,6 $\pm$ 11,7	31,7 $\pm$ 7,9	35,8 $\pm$ 4,2
<b>C20/A80</b>	37,5 $\pm$ 6,9	31,7 $\pm$ 2,4	36,7 $\pm$ 6,1
<b>C50/A50</b>	38,9 $\pm$ 9,6	25,6 $\pm$ 1,9	35,0 $\pm$ 5,8
<b>C80/A20</b>	31,7 $\pm$ 6,4	28,9 $\pm$ 5,1	33,3 $\pm$ 4,7

En el caso de la ALP (tabla 23) sólo se observan diferencias significativas para el sistema C50/A50 en el primer día de tratamiento, valores que al igual que ocurre en el caso de la AST se recuperan al avanzar los días después del tratamiento.

**Tabla 23. Marcadores bioquímicos en plasma. Medidas de ALP en plasma sanguíneo de las ratas tratado con heparina a tres tiempos diferentes (0, 21 y 30 días) tras la administración de los nanosistemas. Todos los datos se presentan como media  $\pm$  SD (n=4). Donde \* d diferencias significativas respecto al grupo control.**

	ALP (U/L)		
	DÍA 1	DÍA 1	DÍA 1
<b>CONTROL</b>	49,8 $\pm$ 4,8	35,2 $\pm$ 7,9	39,4 $\pm$ 7,9
<b>C20/A80</b>	36,6 $\pm$ 7,6	36,6 $\pm$ 2,6	39,4 $\pm$ 4,7
<b>C50/A50</b>	26,9 $\pm$ 9,1*	36,6 $\pm$ 2,6	33,9 $\pm$ 4,7
<b>C80/A20</b>	56,2 $\pm$ 1,6	47,0 $\pm$ 3,9	36,9 $\pm$ 6,4

Todos los marcadores de daño hepático revelan ausencia de daño al encontrarse dentro de los intervalos determinados como normales (57,49-95,55 U/L para la AST, 22,66-51,66 U/L para la ALT y 31,79-60,81 U/L para la ALP) (Hernán & Quiceno 2009).

Los valores de los marcadores de daño renal, BUN y creatinina, se muestran en la tabla 24.

**Tabla 24. Medidas de CRE y BUN en plasma sanguíneo de las ratas tratado con heparina a tres tiempos diferentes (0, 21 y 30 días) tras la administración de los nanosistemas. Todos los datos se presentan como media  $\pm$  SD (n=4). Donde \* diferencias significativas respecto al grupo control**

	CREATININA (mg/dL)			BUN (mg/dL)		
	DÍA 1	DÍA 21	DÍA 30	DÍA 1	DÍA 21	DÍA 30
Control	0,23 $\pm$ 0,07	0,21 $\pm$ 0,09	0,21 $\pm$ 0,07	24,5 $\pm$ 3,3	22,1 $\pm$ 0,4	22,2 $\pm$ 4,3
C20/A80	0,19 $\pm$ 0,07	0,27 $\pm$ 0	0,27 $\pm$ 0,15	24,1 $\pm$ 3,6	15,1 $\pm$ 3,9	21,8 $\pm$ 3,1
C50/A50	0,19 $\pm$ 0,07	0,40 $\pm$ 0*	0,23 $\pm$ 0,07	25,8 $\pm$ 1,8	20,1 $\pm$ 1,9	21,4 $\pm$ 4,6
C80/A20	0,19 $\pm$ 0,07	0,21 $\pm$ 0,09	0,40 $\pm$ 0*	23,5 $\pm$ 3,1	34,6 $\pm$ 1,9*	24,3 $\pm$ 4,5

Los valores de los parámetros bioquímicos relacionados con daño renal, creatinina y BUN, muestran cómo se produce un aumento significativo de la creatinina con respecto a los valores del grupo control en el caso del sistema C50/A50 el día 21 después del tratamiento y del sistema C80/A20 el día 30 después del tratamiento. Aunque unos valores elevados de estos parámetros se relacionan con un daño renal, los valores obtenidos para la creatinina están dentro de los rangos considerados normales (0,23-0,92 mg/dL) por lo que se descarta un daño renal agudo (Hernán & Quiceno 2009; Wolford et al. 1986).

#### 7.4 Estudios antioxidantes en órganos

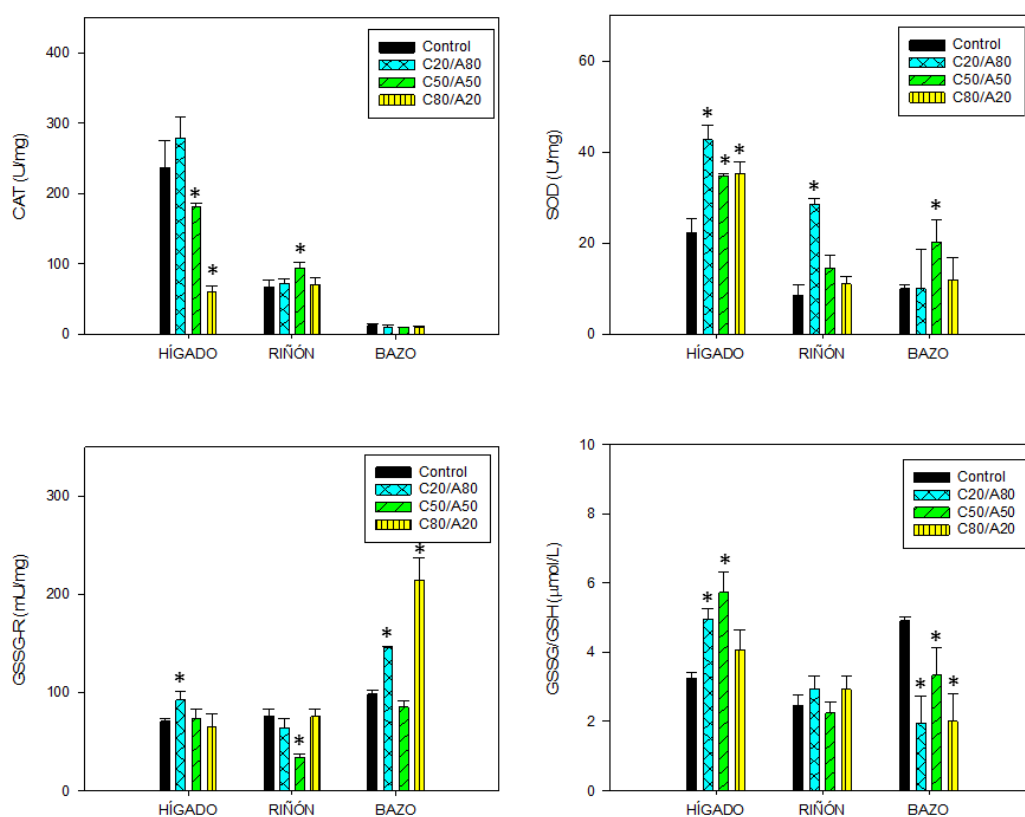
Las nanopartículas pueden alterar la generación de las especies reactivas de oxígeno (ROS, por ello se determinó si se produce alteración en las defensas antioxidantes. Para ello se midieron distintas enzimas antioxidantes: superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutathione reductasa (GR) así como otras especies relacionadas como el glutathione total.

Las determinaciones se realizaron tanto en hígado y riñón, por tratarse de órganos de depuración como se ha explicado previamente, así como en el bazo, órgano implicado en el sistema inmunitario, ya que los resultados pusieron de manifiesto una alteración en los leucocitos.

Los resultados derivados de este estudio se muestran en la figura 56. En el caso del hígado, se ve cómo las nanopartículas de composición C20/A80 afectan tanto a la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) como a la cantidad de glutathione total aumentando sus valores significativamente con respecto a los controles. Las nanopartículas de composición C80/A20 eleva los niveles de superóxido dismutasa mientras que la actividad enzimática de la catalasa disminuye significativamente. La actividad de la glutathione reductasa en hígado no se vio significativamente afectada por ninguno de los nanosistemas.

En el riñón, el sistema C50/A50 produce un aumento de la actividad de catalasa y una disminución de la glutatión reductasa. Sin embargo, el resto de parámetros en el riñón no se vieron afectados por la administración de los nanosistemas.

En el bazo, todos los sistemas afectaron a la cantidad total de glutatión haciendo que los valores fuesen más pequeños con respecto a los de los controles. El sistema C50/A50 aumentó la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) y el sistema C20/A80 aumentó la actividad de la glutatión reductasa.



**Figura 56. Defensas antioxidantes (catalasa, superóxido dismutasa, glutatión reductasa y glutatión total) de los órganos hígado, riñón y bazo tras la extracción. Todos los resultados se expresan como media  $\pm$  SD (n=4). \* Diferencias significativas respecto al grupo control**

De acuerdo con estos datos tanto el hígado como el bazo fueron los órganos más afectados a nivel de estrés oxidativo por la inclusión de las nanopartículas.

## 7.5 Histologías

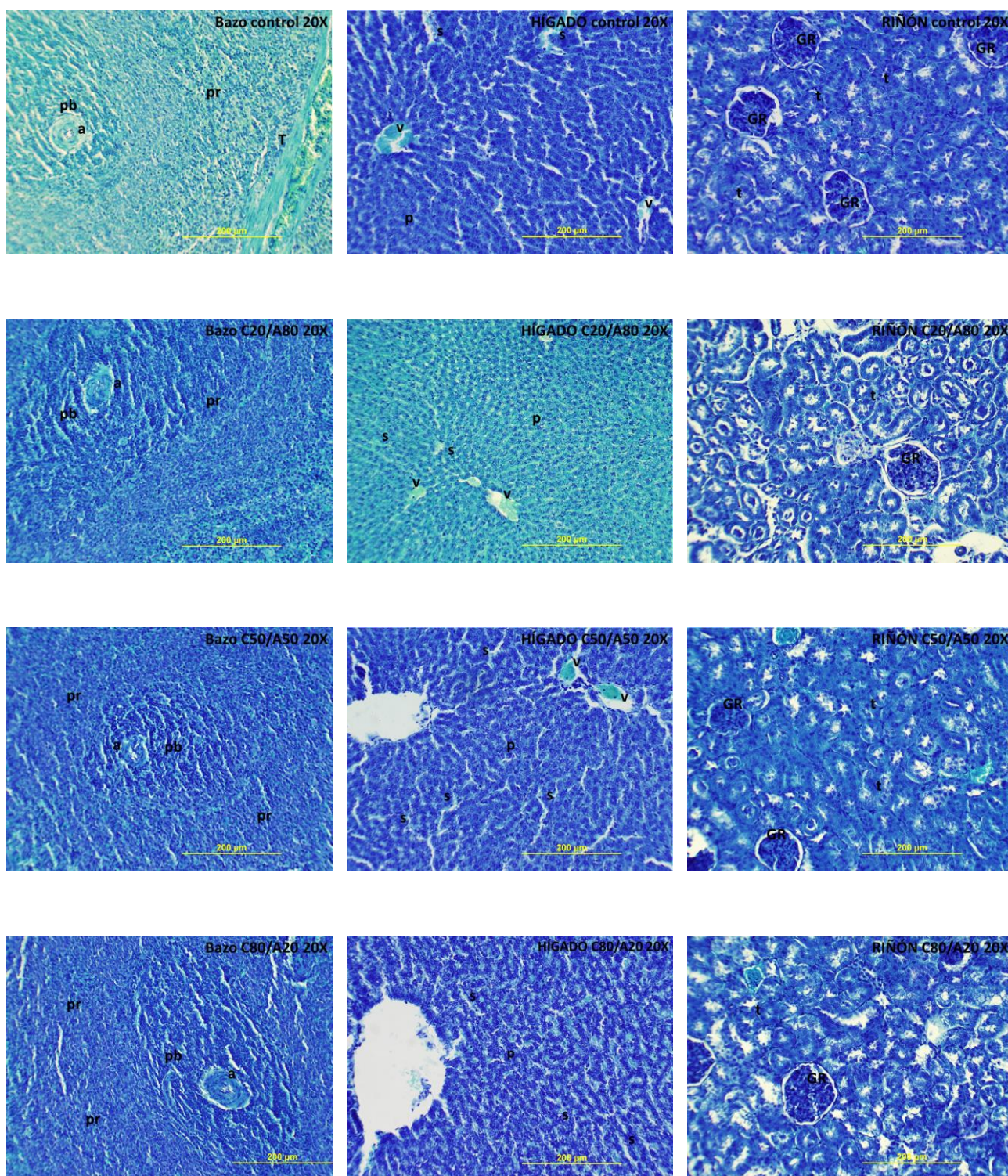
La inclusión de las nanopartículas en el torrente sanguíneo y su circulación por el organismo hace posible que sean accesibles a diferentes órganos. Los órganos con defenestraciones o con el revestimiento endotelial incompleto, como es el caso de hígado y bazo, favorecen la permeabilidad de los órganos a estas nanopartículas y la acumulación de las mismas, como puede ocurrir en los riñones.

Este contacto de los órganos con las nanopartículas puede conllevar alteraciones en la estructura de los mismos. A pesar de que el índice organosomático evidenció que no se había producido un aumento o disminución del tamaño de ninguno de estos órganos, podrían observarse daños a nivel celular. Esto hizo que se llevasen a cabo estudios histológicos de hígado, riñón y bazo con diferentes tinciones con el fin de comprobar posibles afectaciones de estos órganos.

Estas tres tinciones son: hematoxilina, azul de toluidina y tricrómico, la realización de distintas tinciones puede ayudar a hacer más visibles alteraciones que de una única forma no podría verse por lo que estos estudios pueden ser complementarios. Las imágenes obtenidas a partir de estos estudios se presentan en las figuras 57, 58 y 59. Al comparar las distintas tinciones, no se aprecian diferencias entre unas y otras. En todas las imágenes se pudo ver cómo las células presentaban una morfología normal, sin ninguna señal de daño, al igual que los tejidos se encontraban estructurados y en ellos se podía observar las estructuras características de cada uno de ellos.

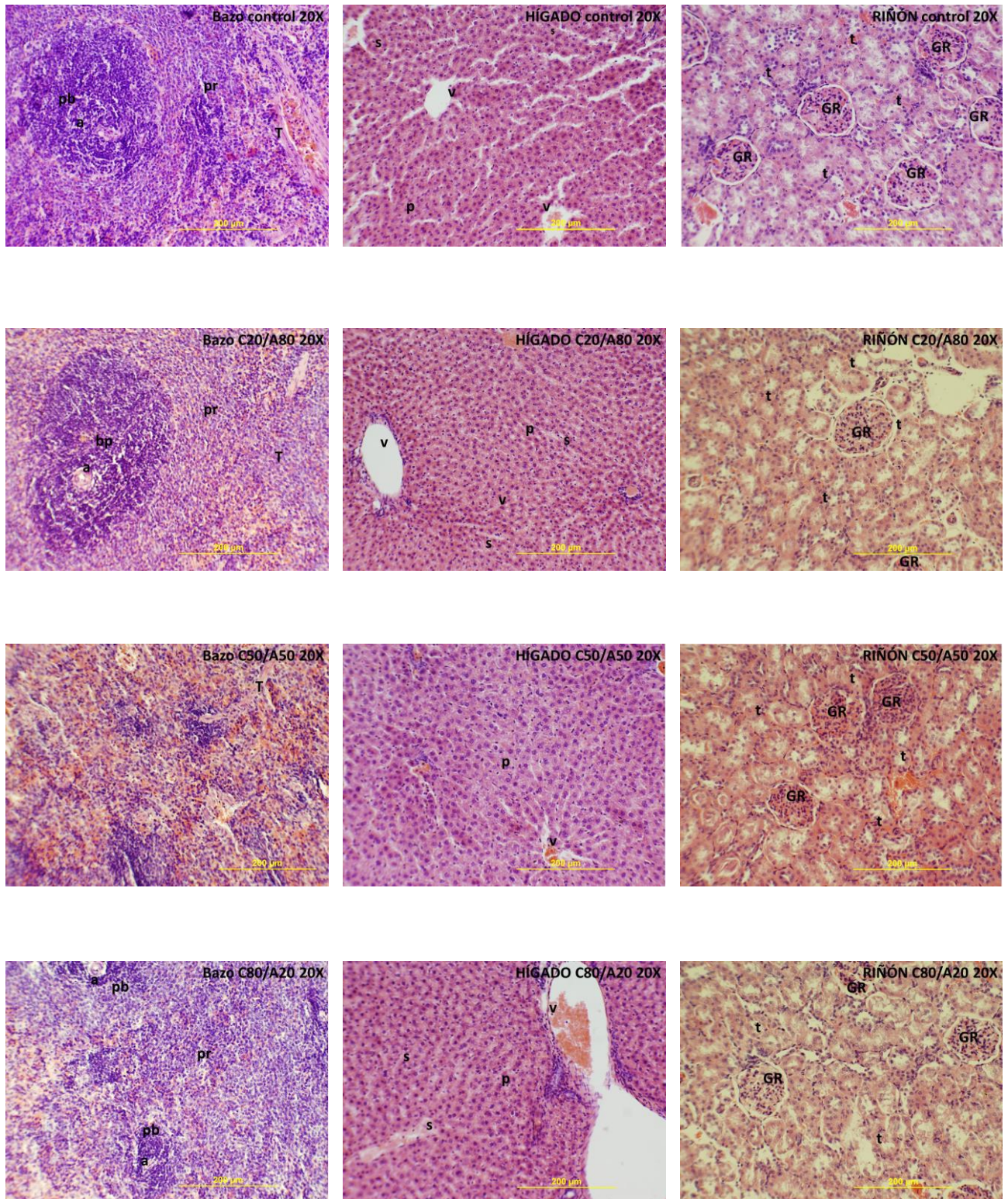
Como se puede observar en la figura, los órganos de los animales a los que se les administraron los distintos nanosistemas no evidencian ningún tipo de respuesta inflamatoria, de procesos de necrosis o de ningún cambio en la morfología tisular. Tampoco se observó ningún rastro de las nanopartículas en ninguna de sus composiciones, para una concentración de 20 mg/kg.





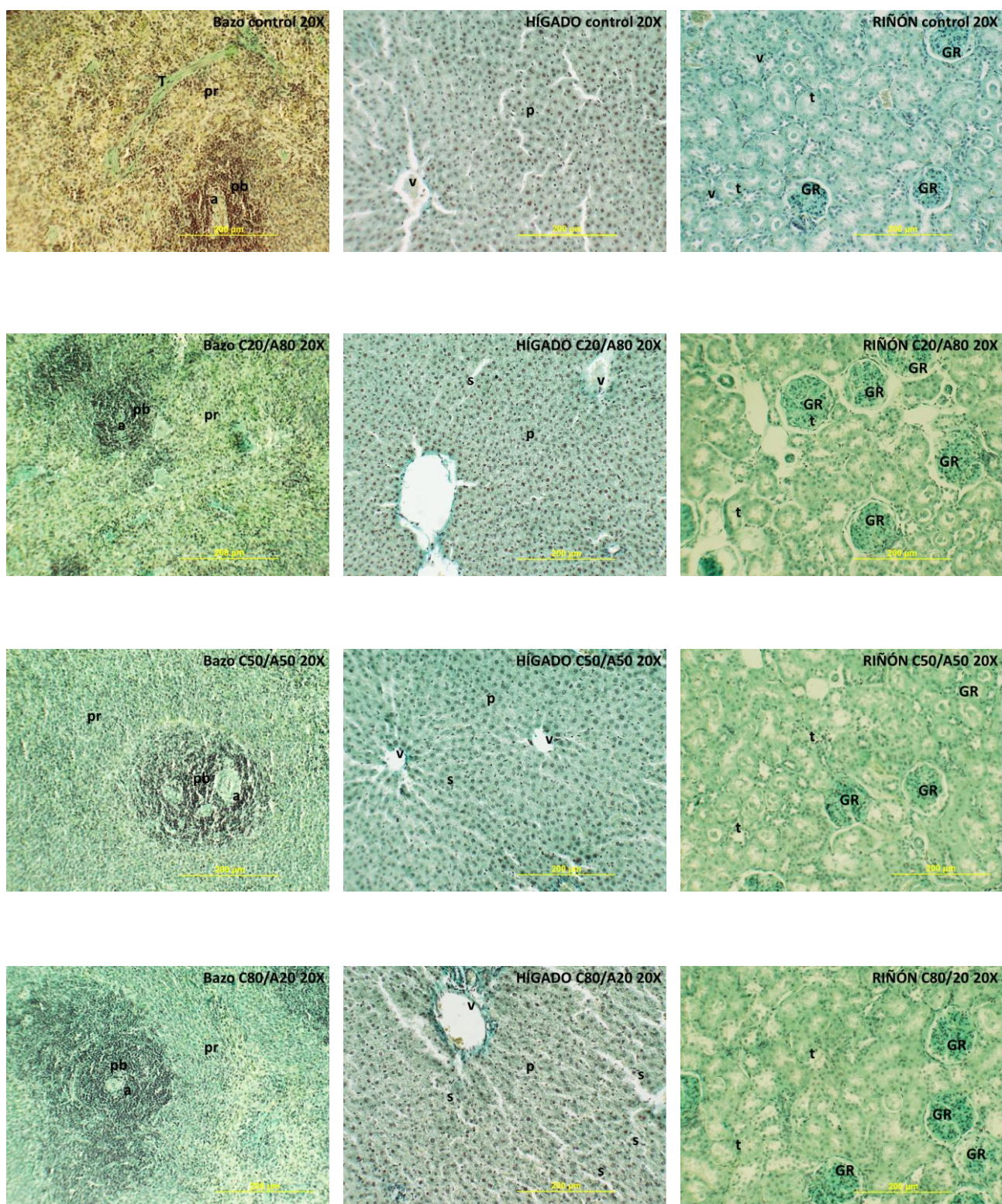
**Figura 57. Imágenes obtenidas por microscopía óptica (20x) de secciones de hígado, bazo y riñón extraídas 30 días después de la inyección (20 mg/kg) y teñidas mediante el método Azul de Toluidina. Donde, v (vénula), s (sinusoide), p (parénquima), GR (glomérulo renal), t (túbulo), pb (pulpa blanca), pr (pulpa roja) y T (trabécula conectiva)**





**Figura 58.** Imágenes obtenidas por microscopía óptica (20x) de secciones de hígado, bazo y riñón extraídas 30 días después de la inyección (20 mg/kg) y teñidas mediante el método Hematoxilina Eosina. Donde, v (vénula), s (sinusoide), p (parénquima), GR (glomérulo renal), t (túbulo), pb (pulpa blanca), pr (pulpa roja) y T (trabécula conectiva)





**Figura 59.** Imágenes obtenidas por microscopía óptica (20x) de secciones de hígado, bazo y riñón extraídas 30 días después de la inyección (20 mg/kg) y teñidas mediante el método Tricrómico. Donde, v (vénula), s (sinusoide), p (parénquima), GR (glomérulo renal), t (túbulo), pb (pulpa blanca), pr (pulpa roja) y T (trabécula conectiva)





An abstract graphic on the right side of the page, consisting of a vertical grey bar with a pattern of interconnected circles and lines in shades of red, green, and grey, resembling a molecular or network structure.

# DISCUSIÓN



## Discusión

En el ámbito de las ciencias biomédicas, ha cobrado especial importancia el campo de la nanotecnología, no sólo en el diagnóstico de determinadas patologías sino también en el tratamiento de las mismas. El cáncer forma parte de este tipo de enfermedades, siendo una de las patologías con mayor incidencia en la sociedad actual. Dentro de los distintos tipos de cáncer, destaca por ser uno de los más comúnmente diagnosticados el de mama. Si bien gracias a los programas de detección precoz se ha conseguido reducir la tasa de mortalidad (Uttley et al. 2016). Además, la supervivencia de las pacientes afectadas ha aumentado gracias a los tratamientos actuales. En muchos de los cánceres de mama juega un papel fundamental la regulación hormonal llevada a cabo por los estrógenos (Santen et al. 2015), por ello, muchas de las alternativas terapéuticas frente a este tipo de patología se han centrado en modular la respuesta estrogénica a través de distintos mecanismos.

La doxorrubicina, un fármaco antineoplásico de amplio espectro empleado en distintos tipos de cáncer dentro de los que destacan el de pulmón, el gastrointestinal o el de mama, presenta una elevada efectividad, sin embargo, también presenta unos numerosos efectos adversos que afectan a múltiples tejidos, destacando los efectos nocivos a nivel cardíaco que genera. Esto restringe su uso ante la aparición de cardiotoxicidad (Hanna et al. 2014).

Aunque la doxorrubicina es soluble en medios acuosos y, por tanto, es factible su administración en disolución acuosa, sus efectos nocivos la hacen un buen candidato a ser vehiculizada mediante sistemas nanoparticulados empleando tanto materiales sintéticos (Oh et al. 2014), como polímeros naturales (Baghbani et al. 2016). Estos últimos presentan ciertas ventajas frente a los polímeros sintéticos, tales como una mejor biocompatibilidad y biodegradabilidad, menor coste económico y gran versatilidad.

Por este último motivo, se seleccionaron dos polímeros naturales, la albúmina sérica bovina (BSA) y el quitosano, para ser empleados en la síntesis y preparación de nanopartículas, que fueron evaluadas tanto *in vitro* como *in vivo*, para la vehiculización y liberación controlada de la doxorrubicina. Además, la presencia de un elevado número de grupos reactivos permitió la unión de una molécula como el ácido fólico, de forma que los nanosistemas así generados pudieran ser reconocidos específicamente por las células tumorales debido a la elevada presencia de receptores de folato existente en estas células, y de esta manera internalizarse en

dichas células y liberar la doxorrubicina, minimizando los efectos adversos que se producen en las células normales.

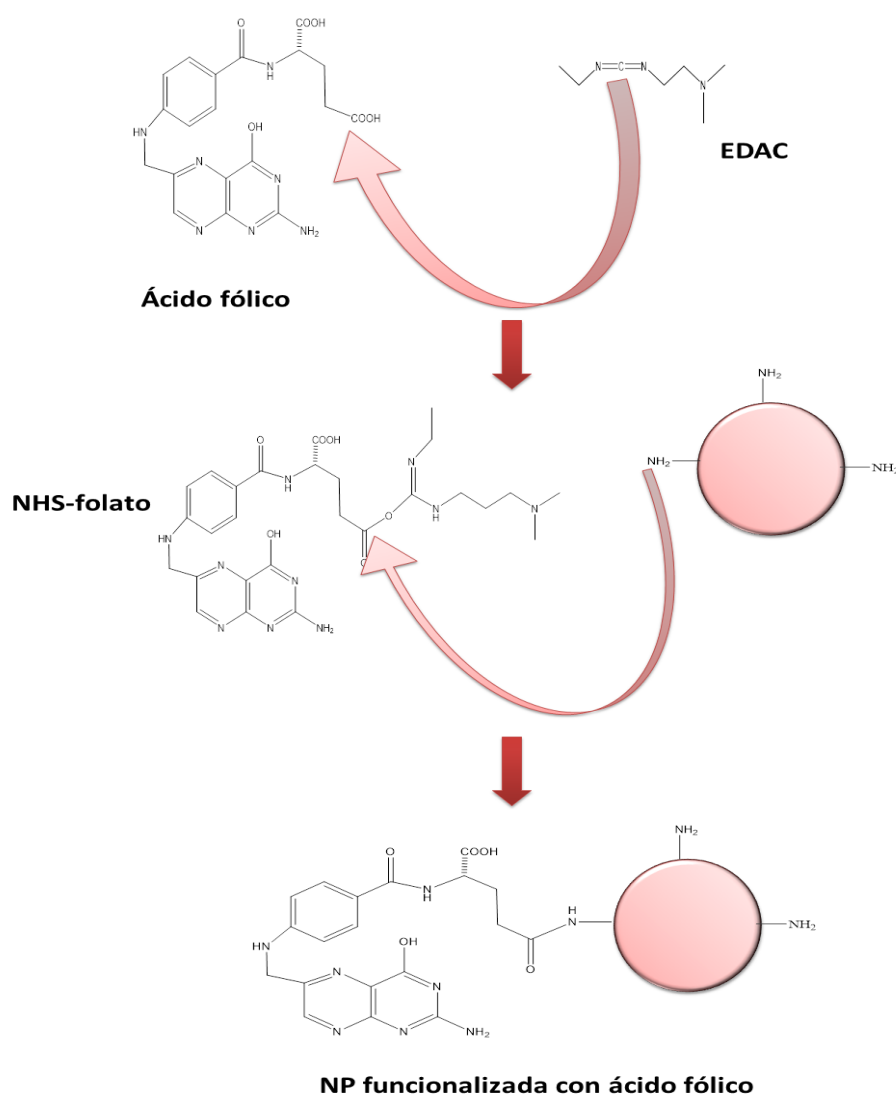
La síntesis de las nanopartículas se llevó a cabo mediante el método de entrecruzamiento iónico. Este método tiene su fundamento en las propiedades iónicas tanto de la albúmina como del quitosano y del tripolifosfato sódico. A pH 3,3, que es el pH al que se lleva a cabo la síntesis, los grupos amino de la albúmina (que presenta un punto isoeléctrico de 4,9) se encuentran protonados y la carga de la proteína en global es positiva. A este valor de pH, el quitosano, cuyo pKa es de 6,5, también tiene sus grupos amino protonados, de forma que su carga global también es positiva. Como ambos polímeros presentan carga positiva, se emplea el tripolifosfato sódico como entrecruzante, ya que al tener sus grupos desprotonados, tiene una carga global negativa y es capaz de servir de unión entre ambos polímeros. El hecho de que la estructura de las nanopartículas se produzca por entrecruzamiento iónico implica que grandes alteraciones de pH afecten a la estructura de la nanopartícula, como quedó demostrado al bajar el pH a niveles inferiores de 1 en los que las nanopartículas se desestructuraban.

Las nanopartículas así sintetizadas, pueden ser utilizadas como sistemas de liberación controlada aprovechando las características de los tumores sólidos, tales como la presencia de vasos sanguíneos defenestrados y el incorrecto sistema linfático presente en los mismos. Este tipo de vehiculización, denominada pasiva, es posible dado el tamaño nanométrico y la forma esférica que presentan las nanopartículas sintetizadas.

Otra forma de dirigir los nanosistemas, denominada vehiculización activa, utiliza la incorporación de moléculas de superficie para el reconocimiento por parte de los receptores de las células tumorales. En este estudio la molécula de superficie es el ácido fólico, cuyo receptor está sobreexpresado en los tumores. Además, esta molécula no es tóxica, no provoca respuesta inmune y es altamente estable (J. Xu et al. 2016; Kaaki et al. 2012). Por ello, tras la síntesis, se procedió a funcionalizar las nanopartículas utilizando el ácido fólico como ligando (figura 60).

La unión del ácido fólico se produjo a través de uno de los grupos ácido del ácido fólico y los grupos amino tanto de la albúmina como del quitosano. Como queda patente en los resultados, cuanto mayor es la cantidad de albúmina presente en la composición de la nanopartícula, mayor es la cantidad de ácido fólico unido a las mismas. Así las de composición C20/A80F unen  $176,0 \pm 6,0$  µg de folato/mg de NP, las de composición C50/A50F unen  $167,0 \pm 13,0$  µg de folato/mg de NP y las de composición C80/A20 unen  $112,0 \pm 0,4$  µg de folato/mg de

NP. Esto parece indicar que la mayor parte de folato unido a las nanopartículas lo hace mediante enlace amida del NHS-folato y grupos amino de la albúmina.



**Figura 60. Esquema del proceso de la activación del ácido fólico y su unión a los grupos amino de las nanopartículas**

Es importante, una vez sintetizadas las nanopartículas, comprobar la capacidad de hinchamiento que presentan las mismas en distintos medios. En este estudio, existe la ventaja de que el fármaco antineoplásico seleccionado es soluble tanto en medio acuoso como en medio orgánico. Por ello, se analizó el hinchamiento en ambos tipos de medio. Los resultados ponen de manifiesto, que el menor grado de hinchamiento se produce en etanol seguido de medios acuosos, agua y PBS a distintos valores de pH, pH 5 propio del microambiente tumoral y pH 7,4 propio del plasma sanguíneo.

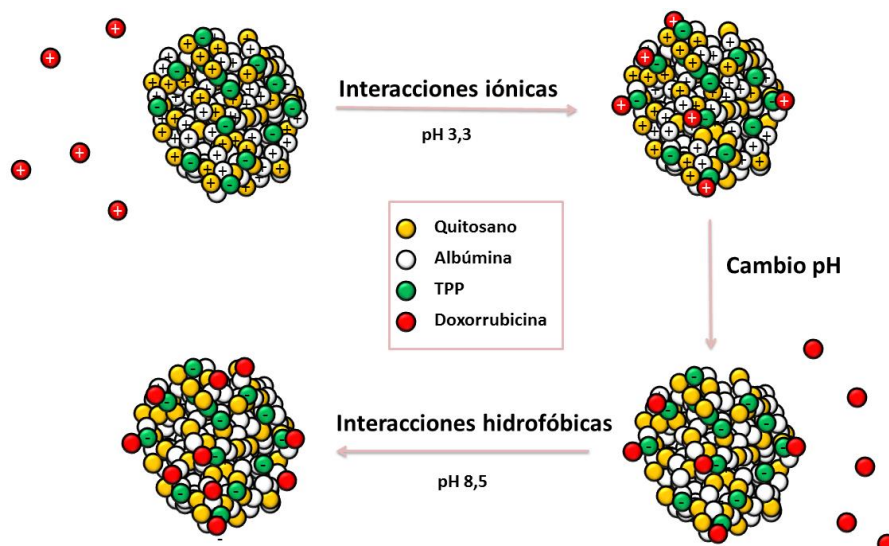
Al comparar los resultados de hinchamiento en agua y en PBS a diferentes valores de pH no se ven diferencias significativas; el agua presenta a su vez la ventaja de un menor contenido en sales que puedan apantallar las cargas de las nanopartículas afectando negativamente a la incorporación del fármaco, por ello se utilizó este medio para incorporar la doxorubicina a las nanopartículas.

La cantidad de fármaco incorporado en los nanosistemas depende tanto de las propiedades de la doxorubicina como de las nanopartículas. Como se puede observar en la imagen (figura 6) la estructura de la doxorubicina presenta varios ciclos y grupos susceptibles de procesos de protonación-desprotonación. Ambas propiedades se utilizaron para la carga del fármaco en las nanopartículas (figura 61).

El pKa de la doxorubicina se encuentra entre 8,94 y 9,53 de acuerdo con los datos obtenidos de DrugBank (<https://www.drugbank.ca/drugs/DB00997>) lo que significa que a valores inferiores a 8, como es el caso del pH de trabajo en torno a 3,3, el fármaco presenta carga positiva. A estos mismos valores de pH tanto la albúmina como el quitosano tienen también cargas positivas, como se ha comentado anteriormente, pero existen cargas negativas proporcionadas por el tripolifosfato sódico a las que la doxorubicina se puede unir.

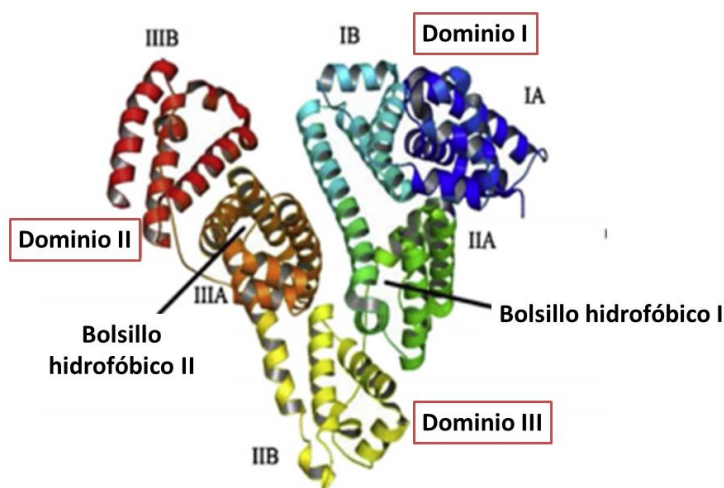
Al basificar el pH (pH en torno a 8), la doxorubicina pierde parte de sus cargas positivas. A este pH no se unirá el fármaco por interacciones iónicas. Este cambio de pH favorece su unión a la albúmina, ya que esta proteína, mayoritaria en el plasma sanguíneo, tiene como función principal transportar distintos compuestos. Esta función transportadora de la albúmina, que determina en gran medida la farmacocinética de numerosos fármacos (Chae et al. 2016), se debe tanto a sus interacciones iónicas (a bajos valores de pH) como a la existencia de bolsillos hidrofóbicos (figura 62) capaces de unir ligandos aromáticos y heterocíclicos (Ashrafi-Kooshk et al. 2015), como es el caso de la doxorubicina.

Los resultados han indicado que entre las nanopartículas cuya composición es C20/A80 y las de composición C80/A20, la eficiencia de incorporación es superior en las que existe una mayor proporción de quitosano. Esto puede ser explicado porque en la unión de la doxorubicina primen las interacciones iónicas frente a la unión de los compuestos heterocíclicos a los bolsillos hidrofóbicos.



**Figura 61. Esquema representativo de las interacciones entre la doxorubicina y las nanopartículas en la inclusión del fármaco**

El hecho de que la composición C50/A50 sea la que muestra una mayor eficiencia de incorporación, parece indicar que es necesario llegar a un equilibrio entre las interacciones iónicas y la carga por los bolsillos hidrofóbicos, de manera que el fármaco que interaccione por cargas iónicas no apantalle la entrada a los bolsillos hidrofóbicos de la albúmina.



**Figura 62. Estructura tridimensional de la estructura de la proteína albúmina sérica humana. En ella se aprecian los bolsillos hidrofóbicos de unión a anillos aromáticos. La estructura cristalina de la proteína se obtuvo de Proteína Data Bank (ID code: 2BXB)**



En todos los casos se observa que la unión del fóllico a las nanopartículas se traduce en un aumento de la carga del fármaco, en el caso de la composición C20/A80 ese aumento se traduce en un incremento del 12% de la eficiencia de incorporación, en un 10% en el caso de la composición C50/A50 y en un 14% en el caso de la composición C80/A20. Como se ha explicado en la unión del fóllico a las nanopartículas, esta interacción se produce principalmente en los grupos amino de la albúmina, y estos, a su vez no están implicados directamente en la unión de la doxorrubicina. Sin embargo, la interacción del fóllico con las nanopartículas, además de proporcionar nuevas cargas negativas procedentes del segundo grupo ácido del fóllico, generaría un aumento de la carga neta negativa de la nanopartícula por la utilización de uno de los grupos amino por la formación del enlace amida con el ácido fóllico. Todo ello contribuiría a una mayor interacción con la doxorrubicina.

Una vez que se hubieron sintetizado las nanopartículas, tanto funcionalizadas con el ácido fóllico como sin funcionalizar, con y sin el fármaco incluido, se procedió a la caracterización de los mismos. Las propiedades físico-químicas tales como el tamaño, la morfología y la estabilidad térmica son fundamentales para el empleo de las nanopartículas como sistemas de liberación controlada.

Dentro de estas características, se ha demostrado que tanto el tamaño como la morfología juegan un papel fundamental en la biodistribución de las nanopartículas en el organismo (J. Huang et al. 2010). La microscopía electrónica de transmisión (TEM) es una técnica que permite evaluar tanto la formación de estructuras como su morfología y su intervalo de tamaños. Nuestros resultados han puesto de manifiesto que todos los sistemas sintetizados, tienen una estructura definida de forma esférica y que está dentro del rango de tamaño nanométrico (8,2 - 34,6 nm). La morfología de las nanopartículas también afecta en gran medida a su incorporación en el interior celular, mientras que las nanopartículas en forma de varilla se incorporan con gran facilidad seguidas de esferas y cilindros, los cubos no son fácilmente internalizados (Pujari-Palmer et al. 2016). Por esto, la forma esférica obtenida puede ser una ventaja para la internalización de las partículas en las células.

En los sistemas en que la doxorrubicina está incluida se observa que presentan un tamaño mayor que las nanopartículas sin fármaco. Este dato de aumento de tamaño al incorporar el antineoplásico en disolución es consecuente con los datos obtenidos en los estudios de hinchamiento, ya que parte del fármaco se incorporará en el interior de la nanopartícula disuelto en agua.

Para confirmar el tamaño de las nanopartículas sintetizadas, se procedió al análisis del mismo a través de la técnica *Dynamic Light Scattering* (DLS). Al comparar los valores de las medidas de tamaño realizadas mediante medidas de dispersión de luz con los obtenidos a partir de las imágenes de microscopía electrónica se observan valores de mayor tamaño (aproximadamente 40 veces superior), manteniéndose en cualquier caso dentro del rango nanométrico. Esta diferencia de tamaños se debe principalmente a la forma en que se determina el mismo en ambas técnicas, así en el caso de la microscopía electrónica las nanopartículas se secan de manera que no se encuentran hinchadas, mientras que en el caso de la técnica de DLS las nanopartículas se encuentran en una suspensión de agua y, por tanto, han incorporado parte del solvente como se observa en los estudios de hinchamiento (Arteche Pujana et al. 2013). Además, la ausencia de agitación favorecería la interacción entre las nanopartículas.

La importancia de que incluso cuando los nanosistemas están en disolución (hinchados) tengan un tamaño nanométrico radica en que se favorece el tiempo de circulación de los sistemas en el organismo, lo que los convierte en principio en buenos sistemas de liberación controlada de fármaco en el microambiente del tumor.

Por tanto, el tamaño nanométrico y la morfología esférica de los nanosistemas estudiados, van a permitir la vehiculización pasiva de los mismos (Ul Ahad et al. 2014). Las nanopartículas pueden llegar a las células tumorales y quedar retenidas en ellas gracias al efecto de permeabilidad y retención aumentada (EPR), característico de los tumores sólidos. Este efecto es debido al rápido crecimiento de los vasos sanguíneos en la angiogénesis y un deficiente sistema linfático, lo que ha despertado un gran interés en la búsqueda de nuevos tratamientos contra el cáncer (Cerqueira et al. 2015), porque al mantener a los nanosistemas en el interior de los tumores sólidos se favorece su internalización en las células, lo que permitirá una liberación sostenida del fármaco empleado en esa localización.

Cabe destacar, que los nanosistemas vehiculizados con ácido fólico tienen un tamaño inferior a los nanosistemas sin vehiculizar. Esto puede deberse a que el fólico unido a las nanopartículas afecte a la capacidad de hinchamiento del quitosano.

Una vez se comprobó el tamaño y la morfología de los sistemas, se realizaron medidas de potencial z. El potencial z da una medida de los cambios en la carga superficial de las partículas en solución, siendo una medida fundamental para entender el comportamiento de

las nanopartículas en una suspensión coloidal y cómo se pueden modificar estas propiedades para conseguir nanosistemas que puedan ser administrados de forma sistémica.

Los resultados de los valores obtenidos para el potencial  $z$  de los sistemas analizados, son consecuentes con los obtenidos en otros estudios (J. Qi et al. 2010), en los que se observa que la albúmina muestra valores negativos de carga, al contrario que el quitosano cuyos valores son positivos, ambos obtenidos a pH de 6,5. Los datos de potencial  $z$  en nuestro caso, tienen valores cercanos a los que presenta el quitosano (15 mV a valores de pH de 6,5) (J. Qi et al. 2010). Este resultado parece indicar que las cadenas protonadas del quitosano se encuentran dirigidas hacia el exterior de la nanopartícula.

Los resultados muestran una disminución de los valores de potencial  $z$  cuando las nanopartículas incorporan el fármaco, esta disminución puede estar relacionada con el hecho de que no toda la doxorrubicina llegue a la parte más interna de la nanopartícula, de forma que quede doxorrubicina en el exterior de la partícula. Por tanto, en el sistema de composición C20/A80, cuyo valor de potencial  $z$  llega a ser negativo, podría significar que en este caso gran cantidad del fármaco ha quedado adherido a la superficie sin llegar a incorporarse en el interior.

Además, los resultados para todas las composiciones hacen pensar que las nanopartículas tendrán cierta tendencia a formar agregados ya que los valores de los potenciales  $z$  no son demasiado elevados. Es necesario tener en cuenta que las partículas en dispersión coloidal están sometidas a fuerzas de atracción y repulsión entre ellas. Teóricamente, valores elevados del potencial  $z$  indican una alta estabilidad de las nanopartículas de acuerdo con la teoría DLVO (*Deryaguin-Landau-Verwey-Oberbeek*) (Hermansson 1999). Sin embargo, desde un punto de vista biológico esta teoría tiene ciertas limitaciones a nivel biológico (Boström et al. 2001), ya que las partículas que presentan valores altamente positivos o negativos del potencial  $z$  suelen ser sometidas a un rápido aclaramiento renal (Taghipour et al. 2014). A pesar de que nuestras nanopartículas tienen una cierta tendencia a agregarse de acuerdo con la teoría DLVO, esto favorecerá un menor aclaramiento de los nanosistemas en el organismo, lo cual les permitiría llevar a cabo la liberación del antineoplásico durante más tiempo. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos mediante la técnica DLS.

Otra de las técnicas que ayudó a confirmar la composición de las nanopartículas, además de comprobar la estabilidad térmica de estas, fue el análisis termogravimétrico (TGA). Los resultados demostraron que todos los sistemas analizados son estables a altas

temperaturas, todas ellas superiores a 190 °C y, por tanto, muy superiores a las temperaturas de trabajo y del organismo. Al comparar todos los perfiles de degradación, se observan diferencias entre los de los sistemas sintetizados y los de los monómeros constituyentes, lo que podría ser debido a la interacción de la albúmina y el quitosano gracias al TPP, lo que daría lugar a unas nuevas estructuras diferentes del quitosano y la albúmina.

Al comparar los perfiles de degradación de las nanopartículas blanco con las cargadas con doxorubicina, se observan unos perfiles muy similares en el caso de las nanopartículas C50/A50-DOX y C80/A20-DOX, sin llegar a observarse en ningún caso los picos de degradación característicos de la doxorubicina, esto puede explicarse como la protección del fármaco al encontrarse unido e incluido en la nanopartícula de manera que no se ve tan afectado por la degradación térmica.

El hecho de que en la composición C20/A80-DOX sí se observe una de las etapas de degradación muy próximas a la de la doxorubicina (a 239 °C) puede significar una distribución diferente del fármaco, que además de incluirse en su interior haya podido quedar unido a la superficie de la nanopartícula, de manera que queda menos protegida a la degradación térmica que la que se encapsula en el interior de las nanopartículas. Estos datos son concordantes con los obtenidos en las medidas de potencial z en los que se demostraba que la carga de doxorubicina en la composición C20/A80 llegaba a disminuir la carga superficial hasta hacerla negativa.

El análisis termogravimétrico de las nanopartículas funcionalizadas da una idea de cómo varían las características de las nanopartículas cuando se vectorizan. La primera etapa de degradación que se observa en todos los casos parece ser característica del ácido fólico (200 °C) ya que la temperatura está muy próxima (en un intervalo 190-197 °C). En el mismo sentido, aparece una segunda etapa de degradación que correspondería con la degradación de las nanopartículas, similar a la que presentan sin funcionalizar. Estos resultados están en concordancia con la cuantificación del ácido fólico unido a las nanopartículas, ya que la composición con mayor incorporación de ácido fólico (C20/A80) presenta un pico más acusado que el de las otras composiciones. Además, el hecho de que se observen temperaturas de degradación similares entre el ácido fólico y la primera etapa de degradación de las nanopartículas vehiculizadas con dicho ligando, está de acuerdo con que esta molécula esté situada en la parte externa de la nanopartícula, lo cual favorecería la posible internalización de las nanopartículas por interacción con el receptor de folato.

Teniendo en cuenta que las nanopartículas sintetizadas tienen como función final liberar el antineoplásico para que este ejerza su acción sobre las células tumorales, tras haber caracterizado los sistemas y comprobar su tamaño nanométrico, su morfología esférica y su estabilidad a elevadas temperaturas, se procedió a determinar cómo se produce la liberación de la doxorrubicina incluida. La cantidad de fármaco liberado y la velocidad a la que se libera dependerán tanto de la disposición del fármaco en la estructura de la nanopartícula como de las interacciones entre ambos.

Para ello se realizaron los estudios de liberación en un medio a pH fisiológico que simulase las condiciones presentes en el organismo. Los resultados obtenidos indican que para todos los sistemas estudiados se produjo una liberación rápida del fármaco (efecto *burst*) durante los 10 primeros minutos. Este efecto puede explicarse como la rápida liberación del fármaco unido débilmente a las nanopartículas en su superficie, lo que estaría de acuerdo con los resultados obtenidos en el potencial z, que indicaban que parte de la carga de la doxorrubicina quedaba en la parte superficial de la misma. Además, la composición con mayor cantidad de doxorrubicina externa es la C20/A80-DOX, ya que es la composición que libera la mayor cantidad de fármaco (43%) durante esos primeros 10 minutos. Esta composición es la que según los datos tanto de potencial z como los obtenidos por termogravimetría tenía la mayor cantidad externa, lo que quedaría corroborado por el estudio de liberación.

Tras la rápida liberación inicial del fármaco, se produjo una salida continuada mantenida en el tiempo para todos los sistemas. Además, cabe reseñar que no en todos los nanosistemas se produce el total de la liberación de la doxorrubicina. En este sentido, las nanopartículas con menor cantidad de quitosano, C20/A80-DOX y C50/A50-DOX, tienen unos tiempos de máxima liberación en torno a las 22 horas, aunque sólo en el primero de ellos se produce la liberación total del antineoplásico. En el sistema de máxima cantidad de quitosano, C80/A20-DOX, la liberación del fármaco encapsulado es del 95% y se prolonga hasta las 47 horas. Este comportamiento está de acuerdo con los resultados de potencial z, que indicaban, como se ha expuesto anteriormente, que la doxorrubicina se localiza en la parte más interna de la nanopartícula.

Los resultados de las nanopartículas funcionalizadas muestran semejanzas con respecto a las sin funcionalizar, de esta forma en todas ellas se observa el efecto *burst* a los 10 minutos de comenzar la liberación. En el mismo sentido se observa, al igual que en los sistemas no funcionalizados, que el tiempo de máxima liberación se produce para el sistema C80/A20F-DOX. Sin embargo, el máximo de liberación se alcanza de manera mucho más rápida en estos

sistemas. Esto puede explicarse como que el fármaco incluido en presencia del ácido fólico puede posicionarse a nivel superficial. Estos resultados concuerdan con el modelo de carga, en el que el ácido fólico unido a las nanopartículas contribuye a una mayor cantidad de doxorubicina unida por interacciones iónicas a la superficie de la nanopartícula ya que es donde se localiza el fólico. La cantidad de doxorubicina liberada en el punto de máxima liberación es porcentualmente menor que en el caso de las nanopartículas equivalentes no vectorizadas.

Además del efecto *burst*, en todas las composiciones se estudiaron las velocidades de liberación, pudiendo dividirse en dos etapas claramente diferenciadas, una primera más rápida que se extiende desde la liberación producida por el efecto *burst* hasta una hora después del inicio de la liberación y una segunda desde la primera hora de liberación hasta el máximo de fármaco liberado. La velocidad de la etapa en la que más diferencias se observa, tanto entre los distintos sistemas como entre los mismos sistemas funcionalizados y sin funcionalizar es la primera, quizá por la diferente disposición de la doxorubicina en la capa superficial de las nanopartículas que es la que primero se liberaría.

Los perfiles de liberación obtenidos son consecuentes con los obtenidos en otros estudios en los que se empleó la doxorubicina como fármaco encapsulado en sistemas de liberación controlada (Hu et al. 2008; Dreis et al. 2007).

Los resultados obtenidos en los estudios de caracterización *in vitro*, permiten considerar que los nanosistemas sintetizados, tanto vectorizados con ácido fólico como sin vectorizar, son unas estructuras prometedoras para ser empleadas como sistemas de liberación controlada. Un segundo paso para su empleo como nanomedicina consiste en evaluar su eficacia como sistema de liberación en diferentes líneas celulares. Teniendo en cuenta que en este estudio el fármaco que se incluye en las nanopartículas es la doxorubicina, fármaco antineoplásico, se seleccionaron para el estudio líneas celulares tumorales, MCF7, HeLa y T47D. Se emplearon diferentes líneas debido a que sus características pueden influir tanto en la internalización de las partículas como en el efecto del fármaco en sí.

La línea celular MCF7 es una línea proveniente de adenocarcinoma humano, al igual que ocurre con la línea celular T47D, ambos tipos celulares presentan receptores de estrógeno en su superficie (Holliday & Speirs 2011). También se utilizó la línea de cáncer de cérvix HeLa, que son negativas en la expresión de receptores de estrógeno en su superficie ([www.atcc.org](http://www.atcc.org)). Como demostraron los estudios de Martínez y col., todas las líneas estudiadas tienen en

común la expresión en su superficie de receptores de folato, siendo mayor esta expresión en el caso de las HeLa y equivalente entre las líneas celulares MCF7 y T47D (Martínez et al. 2014).

Los estudios de viabilidad a diferentes concentraciones muestran que, en el caso de la línea celular MCF7, se observa un comportamiento diferente para cada composición de las nanopartículas no funcionalizadas. Así, parece que la citocompatibilidad de las nanopartículas sin fármaco está relacionada directamente con la cantidad de albúmina y quitosano en las mismas. En este sentido, las nanopartículas con menor cantidad de quitosano (C20/A80) presentan una baja toxicidad, ya que incluso a la mayor concentración de nanopartículas estudiada se mantiene una viabilidad del 80%. Cuando aumenta el porcentaje de quitosano en la composición, C50/A50, el comportamiento es semejante si bien se reduce prácticamente a la mitad la viabilidad (40%). En las nanopartículas con mayor contenido en quitosano, C80/A20, la reducción en la viabilidad es mucho más acusada y no supera el 20% a las mayores concentraciones. Es importante reseñar, sin embargo, que esta reducción en la viabilidad se produce cuando se utilizan concentraciones de nanopartículas muy elevadas (12,20 mg NP/mL).

Esto se puede explicar cómo la capacidad de las células de utilizar la albúmina como nutriente, de forma que es capaz de mantener la viabilidad (Terada et al. 2003). Sin embargo, el quitosano, procedente de la quitina y presente en el citoesqueleto de ciertos organismos puede no ser tan bien digerido por falta de enzimas específicas capaces de degradarlo y, por tanto, disminuye la viabilidad cuando se utiliza en nanopartículas que tienen este compuesto en elevadas proporciones en su composición.

En el caso de las nanopartículas cargadas con el fármaco, se sigue una misma tendencia, en la que las partículas de composición C20/A80-DOX necesitan concentraciones muy elevadas (19,23 mg NP/ml), para causar la misma muerte celular que la doxorubicina en disolución. Sin embargo, la composición C80/A20-DOX origina para todas las concentraciones la misma muerte celular que la doxorubicina en disolución.

Las diferencias encontradas en la citotoxicidad según las nanopartículas utilizadas, se deberán fundamentalmente a la composición de los sistemas, ya que el experimento se llevó a cabo utilizando concentraciones equivalentes de fármaco de todas las composiciones por lo que la concentración de nanopartículas es diferente en cada uno de los ensayos. Además la composición C80/A20-DOX que presenta la mayor citotoxicidad es, sin embargo, la que alcanza en mayor tiempo el máximo de liberación, lo cual estaría en concordancia con que en la

viabilidad celular influya más la cantidad de quitosano presente en la composición que la cantidad de doxorubicina liberada.

En esta misma línea celular (MCF7), pero con las nanopartículas funcionalizadas con ácido fólico, se repite el hecho de que tanto las nanopartículas de composición C20/A80F como las de composición C50/A50F no reducen la viabilidad por debajo del 80%, siendo las de composición C80/A20F las más citotóxicas.

En este caso, lo que sí se observa son diferencias entre las nanopartículas funcionalizadas y cargadas con fármaco y el fármaco en disolución. Así, a bajas concentraciones (equivalentes a 0,01, 0,1 y 1  $\mu\text{g/mL}$  de doxorubicina), todas las composiciones de nanopartículas (C20/A80F-DOX, C50/A50F-DOX y C80/A20F-DOX) producen una mayor muerte celular que el fármaco en disolución. Esto podría deberse a que se favorecería la internalización de las nanopartículas funcionalizadas con ácido fólico en el interior celular gracias a la presencia de los receptores de folato.

Estudios de otros investigadores han puesto de manifiesto que la doxorubicina encapsulada en nanopartículas de poli-etilenglicol o poli-etiletilenfosfato (PEEP) son capaces de evadir la acción de la glicoproteína-p, la cual está implicada en los mecanismos de resistencia a fármacos (Y. C. Wang et al. 2011). La forma en que la doxorubicina activa dichos mecanismos puede estar relacionada con la expresión de los genes GSTM1 y GSTA1-3 (Drozdz et al. 2016).

Por tanto, nuestras nanopartículas, además de la mayor internalización gracias a los receptores de folato, podrían estar inhibiendo los mecanismos de resistencia múltiple a fármacos y, así, ser más citotóxicas que cuando se utiliza la doxorubicina en disolución. El hecho de que se inhiban los mecanismos MDR es una ventaja, ya que en muchos casos la protección de las células frente a los fármacos es una de las razones por las que la quimioterapia no consigue ser efectiva. En consecuencia la encapsulación del fármaco en sistemas de liberación controlada es una de las posibles mejoras en el tratamiento con antineoplásicos.

En el caso de la línea celular HeLa, las nanopartículas sin fármaco y sin funcionalizar son citocompatibles, llegando a verse aumentada la viabilidad de las células a la concentración de nanopartículas más elevada para la composición C20/A80. En este caso se vuelve a observar que la citocompatibilidad de las nanopartículas está directamente relacionada con la cantidad de albúmina en las mismas. El hecho de que las nanopartículas blanco de mayor proporción de



albúmina lleguen a aumentar la viabilidad a elevadas concentraciones puede tener su explicación en el metabolismo celular de esta línea celular ya que este es muy acelerado (Terada et al. 2003).

Sin embargo, en esta línea celular (HeLa), la administración de doxorrubicina encapsulada en las nanopartículas funcionalizadas con ácido fólico no reduce la viabilidad por debajo de la que produce el fármaco libre, lo que puede significar que en esta línea celular los mecanismos de resistencia a fármacos no son tan acusados como en otras líneas celulares. Este dato se encuentra en concordancia con estudios en los que se demostró que la resistencia a fármacos en la línea celular HeLa tratada con doxorrubicina no era tan drástica como en otras líneas tumorales de cérvix humano como las KB-V1 (Drozd et al. 2016).

En la línea celular T47D se observa la misma tendencia de las nanopartículas blanco sin funcionalizar, a mayor proporción de quitosano, mayor muerte celular. En este caso se vuelve a producir mayor citotoxicidad de las nanopartículas funcionalizadas con ácido fólico y que encapsulan el fármaco que el fármaco libre a bajas concentraciones. Esto hace pensar que, como ocurría en la línea celular MCF7, están implicados mecanismos de resistencia a fármacos. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por Wosikowski y col. en los que quedaba patente la resistencia a la doxorrubicina tanto de MCF7 como de T47D (Wosikowski et al. 1995).

Por todo ello, podemos observar que las nanopartículas se comportan de forma semejante, respecto a la viabilidad, en las líneas celulares MCF7 y T47D, en donde se observa el efecto de la funcionalización de las nanopartículas con fólico y la posible inhibición de los mecanismos de resistencia múltiple a fármacos. En el caso de HeLa, la citotoxicidad es debida fundamentalmente a la internalización gracias a los receptores de folato de las nanopartículas funcionalizadas.

Estos datos evidencian la citocompatibilidad de las tres composiciones de nanopartículas, ya que únicamente los casos en los que se produce muerte celular con las nanopartículas blanco, funcionalizadas y sin funcionalizar, es necesario llegar a elevadas concentraciones de nanopartículas. Además, se pone de manifiesto la utilidad de las nanopartículas funcionalizadas con fólico en la terapia del cáncer *in vitro*.

Se conoce como concentración máxima inhibitoria ( $IC_{50}$ ) a la concentración de un fármaco para conseguir una inhibición *in vitro* de una función bioquímica (Croteau et al. 2010), en nuestros estudios correspondería con la concentración a la que se produce una reducción

del 50% de la viabilidad. Uno de los principales problemas a la hora de comparar el  $IC_{50}$  de fármacos quimioterapéuticos es la dificultad de unificar estos datos entre diferentes experimentos (He et al. 2016). Por ello, y con la idea de obtener una idea de cómo afectan las nanopartículas con fármaco y sin él respecto al fármaco libre en disolución, se halló el valor de  $IC_{50}$  de todas las composiciones así como del fármaco libre.

Como queda reflejado en la tabla 18, para el sistema C20/A80 no es posible calcular el valor de  $IC_{50}$  ya que no se produce una muerte celular del 50% incluso a valores elevados de la concentración de nanopartículas, independientemente de la línea celular, al igual que sucede en la composición C50/A50 pero sólo en la línea celular T47D. En el caso de las otras composiciones sin funcionalizar y para todas las líneas celulares, sí fue posible determinar el valor de  $IC_{50}$ , el cual disminuye al aumentar la cantidad de quitosano en la composición polimérica.

Al comparar los resultados para el  $IC_{50}$  de las nanopartículas funcionalizadas con ácido fólico, observamos que en general disminuye el  $IC_{50}$  respecto a las no funcionalizadas. Este comportamiento se puede explicar como una mayor incorporación de los nanosistemas en el interior celular, como se ha visto en otros estudios de liberación de doxorrubicina a partir de conjugados empleando entre otras la línea celular MCF7 (Cao & Feng 2008).

Los valores más representativos de  $IC_{50}$  son los obtenidos en las nanopartículas con fármaco incluido. En todas ellas se consiguen valores de  $IC_{50}$  inferiores a las de sus homónimas sin fármaco, llegándose a alcanzar el valor de  $IC_{50}$  del fármaco libre (C20/A80-DOX, C50/A50-DOX y C80/A20-DOX). Esto implica que la encapsulación del fármaco en las nanopartículas no ha producido un descenso en la eficacia del mismo (Dreis et al. 2007). Además, estos resultados contrastan con los obtenidos por Xu y col. en los que al encapsular la doxorrubicina en dendrímeros, se aumentan los valores de  $IC_{50}$  respecto a los de la doxorrubicina en disolución, por lo que no se produce una liberación eficiente del fármaco (S. Xu et al. 2009).

Cuando se comparan los valores del  $IC_{50}$  de las nanopartículas funcionalizadas con ácido fólico y el fármaco incluido y las nanopartículas con doxorrubicina sin funcionalizar, se observan valores inferiores en todos los casos de  $IC_{50}$  para las primeras. Esto puede explicarse como una mayor muerte celular debido a una mayor incorporación de los sistemas al interior celular.

También es importante determinar cómo afectaban las distintas composiciones de nanopartículas a lo largo de varios días de tratamiento (1, 3 y 6 días). La respuesta de las

distintas líneas celulares frente a distintos agentes exógenos no tiene por qué ser similar, ni la respuesta frente a un mismo agente a diferentes tiempos. La concentración escogida para estos estudios derivó de las curvas dosis-respuesta. Esta concentración se escogió gracias al estudio de diferentes concentraciones de nanopartículas a 24 horas, en el que se producían diferencias entre las células que incorporaban fármaco y las que no, sin llegar a producir una muerte celular completa a las 24 horas y, por tanto, poder establecer diferencias entre ellas.

En el caso de la línea celular MCF7, después de un día de tratamiento, no existen diferencias significativas entre las nanopartículas con fármaco incluido y sin incluir. Esto está de acuerdo con los estudios de liberación del fármaco realizados *in vitro*, ya que en la mayoría de los sistemas la liberación no era total sino que parte de la doxorrubicina a las 22,5 horas quedaba retenida en la nanopartícula. Por tanto, se necesitaron 3 días para que se empezasen a ver descensos de viabilidad producida por las nanopartículas con fármaco incluido.

El descenso de la viabilidad de las nanopartículas que incluían el fármaco no fue tan acusado como el que se produjo con el fármaco en disolución. Teniendo en cuenta que en determinados nanosistemas como el de composición C20/A80-DOX a las 22,5 horas habrían liberado todo el fármaco y que el C80/A20-DOX habría liberado prácticamente el total a las 47 horas, la diferencia de comportamiento de estos sistemas con respecto a la doxorrubicina en disolución, puede deberse a que en los estudios de liberación *in vitro* se hicieron en un medio similar al del citoplasma celular en términos de pH pero no se controlaron otros posibles factores que afecten a la liberación, tales como la inclusión de las nanopartículas en lisosomas, la presencia de iones y/o la posible interacción de las nanopartículas con proteínas citoplasmáticas que dificulten la salida del fármaco. Tras 6 días de tratamiento, se empezaron a ver disminuciones inferiores al 20% para las composiciones C20/A80-DOX y C50/A50-DOX.

En las líneas celulares HeLa y T47D se obtuvieron resultados similares, con una disminución de la viabilidad en el tercer día de tratamiento para la doxorrubicina en disolución y sólo al sexto día se empezó a ver muerte celular. Esto implica que las distintas composiciones de las nanopartículas a concentraciones bajas de doxorrubicina incluida (1 µg/mL) afectan de la misma manera a las diferentes líneas celulares.

Al comparar este estudio con el realizado con las mismas composiciones de nanopartículas funcionalizadas con ácido fólico, se comprobó que a partir del tercer día en las líneas celulares HeLa y T47D ya se observaba un detrimento de la viabilidad celular, llegando a ser similar al de la doxorrubicina en disolución el sexto día de tratamiento (alcanzando casi por completo la muerte celular).

Estos resultados indican que las nanopartículas funcionalizadas con ácido fólico tienen una mayor repercusión en la viabilidad celular que las nanopartículas no funcionalizadas también a diferentes tiempos. Este hecho ha de estar relacionado con la forma de internalización en la célula, y parece indicar que o bien con el ácido fólico se produce una mayor internalización o bien que la ruta de internalización que siguen estas nanopartículas afecta en mayor medida a las células.

Para asegurar que la acción de las nanopartículas se debe a su internalización celular y no a su posible acción externa, se realizaron estudios de incorporación celular, *uptake*, mediante la encapsulación de un fluoróforo a los nanosistemas. La utilización de un fluoróforo, es un método muy empleado para evaluar la internalización de las nanopartículas (Ding et al. 2005; Panyam et al. 2003). Por tanto, la presencia de este fluoróforo en las células medida mediante microscopía permitió evaluar el grado de internalización de las nanopartículas en el interior celular.

En los resultados obtenidos, se demuestra que tanto las nanopartículas vectorizadas como sin vectorizar se internalizan en el interior celular. En el caso de las nanopartículas que no tienen ácido fólico en su composición, el mecanismo de internalización tiene que ser por procesos de endocitosis/pinocitosis.

En el caso de los nanosistemas vehiculizados, es necesario conocer si en las líneas celulares estudiadas existe una sobreexpresión de los receptores de folato, que permitan la inclusión de las nanopartículas en el interior celular. Como se ha expresado previamente, la sobreexpresión de dichos receptores en la superficie de nuestras líneas celulares ha sido demostrada en estudios previos realizados por Martínez y col. en el año 2014 (Martínez et al. 2014).

En nuestros resultados se ha demostrado que el ácido fólico en la composición de las nanopartículas favorecía la inclusión de las mismas en el interior celular, comparativamente con los nanosistemas sin vehiculizar.

Al analizar la internalización de las nanopartículas funcionalizadas con ácido fólico en las distintas líneas celulares (figura 46) no se aprecian diferencias significativas entre los distintos tipos celulares, a pesar de que la línea celular HeLa expresa una mayor proporción de receptores de folato en su superficie (Martínez et al. 2014). Esta situación quedaría corregida cuando se considera el número de células sembradas por pocillo, que es la mitad en el caso de HeLa, dada su tasa de crecimiento. Por ello, la internalización de las nanopartículas

vectorizadas con ácido fólico, considerando esta variable, puede considerarse superior en la línea celular HeLa.

La forma de comprobar que la inclusión en el interior celular se debe a dichos receptores de folato, es realizar un experimento en el que se bloqueen dichos receptores, previamente a la inclusión de las nanopartículas. Los resultados ponen de manifiesto que se produce una disminución de la incorporación de los sistemas funcionalizados, al bloquear a los receptores. Sin embargo, en todos los sistemas analizados, se sigue produciendo la captación al interior celular, esto puede ser debido a que no todos los receptores de folato presentes en la superficie celular habrán sido bloqueados, y/o a que la internalización de las nanopartículas se produzca por medios diferentes al reconocimiento por los receptores de folato.

Todos los resultados vistos en el *uptake* corroboran los resultados mostrados para la citocompatibilidad y citotoxicidad que producen las nanopartículas de distintas composiciones analizadas.

Aunque queda patente, según los resultados, que las nanopartículas son citocompatibles, sí que se observa una pérdida de viabilidad celular al estar en contacto con las distintas líneas celulares. Esta citotoxicidad puede deberse a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Por ello, se analizó la producción de estas especies tras añadir las distintas composiciones de nanopartículas.

A pesar de que gran parte de la reducción de la molécula de oxígeno se produce sin la formación de especies reactivas, hay una pequeña parte que sí se produce como consecuencia del metabolismo celular. Además de estas especies reactivas de oxígeno producidas por el metabolismo celular, existen ciertas situaciones en las que su producción se ve aumentada. Un ejemplo es el caso de las infecciones, en las que uno de los mecanismos de defensa del organismo frente a determinados agentes patógenos es la liberación de radicales libres de oxígeno. Otra situación que genera ROS es el contacto con ciertos productos químicos o la exposición a ciertas condiciones medioambientales, como son las radiaciones ultravioleta.

Se puede definir la oxidación de un compuesto como la pérdida de electrones, de hidrógenos o la ganancia de un oxígeno por parte de este compuesto. De la misma forma, la reducción es el proceso inverso; es decir, la ganancia de electrones o hidrógenos o la pérdida de átomos de oxígeno. Estos procesos se llevan a cabo continuamente en el ambiente celular, ocupando el oxígeno un papel fundamental y encontrándose implicado en la mayoría de

oxidaciones intracelulares de sustratos, en las que el paso último es la reducción del oxígeno a agua catalizada por la citocromo C oxidasa.

Sin embargo, existen especies capaces de reducir al oxígeno cediéndole sus electrones de uno en uno, produciendo radicales libres de oxígeno. Estos radicales de oxígeno se caracterizan por tener un electrón desapareado muy reactivo que puede interaccionar con grandes biomoléculas produciendo reacciones en cadena y afectando a la integridad de la célula. Las especies reactivas de oxígeno (ROS) formadas en la reducción del oxígeno y que pueden afectar a la célula son: el anión superóxido ( $O_2^-$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el radical hidroxilo libre ( $OH\cdot$ ) (Zorov et al. 2014).

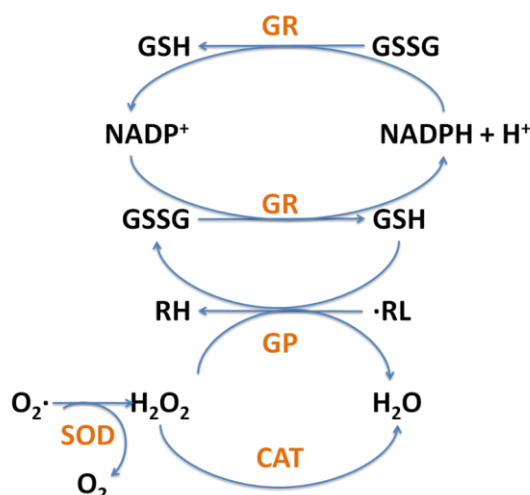
De acuerdo con los resultados obtenidos, la inclusión de las nanopartículas funcionalizadas y sin funcionalizar en las distintas líneas celulares, produce un aumento en las especies reactivas de oxígeno. Como no se observan diferencias significativas, entre las nanopartículas con ácido fólico en su composición y las que no están vehiculizadas, la producción de ROS no se ve afectada por la mayor inclusión de las nanopartículas vectorizadas.

La generación de especies reactivas de oxígeno conlleva la existencia de estrés oxidativo, que en determinadas líneas celulares, por ejemplo, MCF7, puede afectar a la resistencia múltiple a fármacos (Cen et al. 2016).

Es importante destacar que la formación de ROS puede llegar a afectar a la integridad celular, por lo tanto, las células disponen de mecanismos de defensa, de forma que se contrarreste la producción de especies reactivas de oxígeno. Estas defensas celulares contra los ROS pueden ser enzimáticas, mediante la actividad de las enzimas superóxido dismutasa, glutathione reductasa y catalasa (Li et al. 2015), o no enzimáticas donde destaca el glutatión (Müller 2015).

Todas estas defensas están conectadas de forma que su actividad se regula en función de la vía que se vea afectada. Las actividades de todas las enzimas implicadas están relacionadas como se observa la figura 63.

Como se ha observado en los resultados obtenidos en los distintos mecanismos de protección frente al estrés oxidativo, las distintas vías de protección se ven afectadas de manera diferente en función de la línea celular y la composición de las nanopartículas, al igual que en función de si están o no vectorizadas.



**Figura 63. Esquema de la relación entre algunas de las defensas antioxidantes**

En el caso de la línea celular MCF7, se ve un incremento de la actividad catalasa en el caso de las composiciones C20/A80 y C50/A50, aumentándose la actividad de esta enzima para neutralizar un incremento en la formación de peróxido de hidrógeno, por una vía independiente a la superóxido dismutasa. Sin embargo, cuando las nanopartículas tienen ácido fólico a una composición C80/A20F, el aumento de la producción de peróxido de hidrógeno, sí puede deberse a la actuación de la superóxido dismutasa, como queda demostrado por el aumento de la actividad de esta enzima que intentaría ser contrarrestado por la catalasa, la cual también presenta un incremento de su actividad.

Sin embargo, en la línea celular HeLa, la actividad de la catalasa no parece verse afectada en ningún caso y la producción de peróxido de hidrógeno sólo tiene un ligero aumento, si bien significativo, en presencia de las nanopartículas de composición C20/A80 sin funcionalizar. El hecho de que no aumente la actividad de la catalasa será debido a la neutralización del  $\text{H}_2\text{O}_2$  por mecanismos diferentes al de esta enzima.

Aunque en el caso de las nanopartículas sin funcionalizar en la línea T47D no se ve afectada la actividad de la catalasa, sí lo hace en presencia de las composiciones funcionalizadas C50/A50F y C80/A20F. Composiciones que también causan un aumento de la actividad de la superóxido dismutasa.

Las defensas antioxidantes que se producen por la vía de la glutathione reductasa y el glutathione total, también se ven afectadas en función de la línea celular y de la composición de las nanopartículas.

Todo ello parece indicar que todas las variables de composición y forma de internalización de las nanopartículas afectan a la vía de protección frente a la formación de especies reactivas de oxígeno (figura 47), pero en todos los casos existen mecanismos que contrarrestan la producción de estas especies, haciendo que estos nanosistemas sean citocompatibles como queda demostrado en los estudios de viabilidad.

Por los resultados obtenidos *in vitro* y *ex vivo*; es decir, en la caracterización de los nanosistemas y los estudios realizados en células, se demuestra que las nanopartículas sintetizadas son unas firmes candidatas para poder ser empleados como sistemas de liberación controlada de fármacos *in vivo*.

Para poder utilizar cualquier material *in vivo* es necesario que este pueda ser empleado como biomaterial; el principal requerimiento de un biomaterial es la capacidad de ser recibido de forma adecuada por el huésped, sin conllevar ninguna respuesta negativa por parte del mismo, es decir, que sea biocompatible (Ul Ahad et al. 2014).

Con el fin de determinar si las nanopartículas de distintas composiciones son biocompatibles se llevaron a cabo estudios para observar cómo afectaban a organismos vivos. Esto se debe a que a pesar de tratarse de polímeros naturales y firmes candidatos a ser empleados como biomateriales sin que presenten efectos secundarios, se ha demostrado que el grado de desacetilación del quitosano es un factor fundamental en la biocompatibilidad del mismo, donde un alto grado de desacetilación puede conllevar reacciones secundarias como la inflamación (Jeong et al. 2016). Además, la combinación de ambos materiales (quitosano y albúmina) combinada en una estructura con TPP, ha generado un material diferente de sus constituyentes que, en última instancia, genere una respuesta diferente a la que tendría un organismo frente al quitosano y la albúmina.

Los estudios de biocompatibilidad pueden ser realizados a diferentes intervalos de tiempo, ya que un agente extraño puede actuar de manera inmediata o puede tener una repercusión a largo plazo. Por ello, las ratas *Wistar* empleadas en el estudio se monitorizaron durante un mes completo, con el fin de asegurar que no se producirían daños asociados a una posible retención de las nanopartículas a lo largo del tiempo.

Tras la administración intravenosa de los sistemas, todos los animales se encontraban en un buen estado de salud, no demostraban ningún comportamiento anómalo, ni reacciones adversas en el lugar donde se produjo la inyección de los sistemas.



El control del peso de los animales confirmó un crecimiento adecuado y un buen estado de salud general, siendo el primer paso para diferenciar a un animal sano de uno enfermo. Existen estudios como el de Catherine J. Waterfield y col. que demuestran una disminución del peso de los animales relacionada con la administración de compuestos hepatotóxicos como el bromobenceno (Waterfield et al. 1991). Como se observó, el ritmo de crecimiento no difería entre los animales tratados con los nanosistemas de los empleados como control, siguiendo una tendencia de incremento de peso similar.

El índice organosomático da una idea de la maduración metabólica de los órganos y del correcto funcionamiento de los mismos, una alteración en hígado, riñón o bazo con respecto a los animales control se relaciona con una posible afectación de los mismos con el tratamiento. (Kura et al. 2014). En este caso, el tratamiento con las nanopartículas no afectó al tamaño de los órganos con respecto al tamaño total, de manera que se descartaron posibles daños que afectasen de forma grave a dichos órganos.

Para determinar la biocompatibilidad de las nanopartículas se estudió cómo afectaban a tejidos que suelen verse implicados en este tipo de tratamientos. Esto incluye en primera instancia a la sangre, debido a la administración intravenosa de las nanopartículas, lo que conlleva una importante interacción entre ambas. La sangre se trata, en realidad, de un tejido complejo y dinámico, fundamental para la estabilidad del organismo, cuya misión principal es conectar al resto de tejidos. Los diferentes componentes de la sangre pueden reaccionar con las nanopartículas incorporadas conllevando una posible alteración de sus parámetros sanguíneos (K. Jain et al. 2010).

Por ello se realizó un estudio hematológico en el que se valoraron los parámetros más importantes relacionados con la fracción celular de la sangre; es decir, con los glóbulos rojos, los glóbulos blancos y las plaquetas.

Con respecto a la línea celular roja, se midieron los hematíes o eritrocitos, células de pequeño tamaño que carecen de núcleo y membranas internas, además de la hemoglobina y del volumen corpuscular medio (MCV). A partir de estas medidas se obtienen de forma indirecta los valores de la hemoglobina corpuscular media (MCH) y la concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM) (Lording 2008).

Valores anormales de eritrocitos y hemoglobina pueden estar relacionados con enfermedades como la anemia, si son anormalmente bajos, mientras que unos valores elevados pueden estar relacionados con otro tipo de afecciones como es la policitemia. Esta

última enfermedad puede deberse a una excesiva producción de glóbulos rojos, pero también podría estar relacionada con una pérdida excesiva de líquido, produciéndose la deshidratación del animal, por tanto, se produciría un aumento en la concentración de proteínas (Madjid & Fatemi 2013).

Klokkevold y col. demostraron una alteración eritrocitaria, alterándose su morfología, en el tratamiento de conejos con una solución de quitosano (Klokkevold et al. 1999). Por lo que, al ser uno de los materiales que componen los nanosistemas de estudio puede afectar de la misma manera a pesar de tratarse de otro modelo animal. En el caso del tratamiento de las ratas *Wistar* con los nanosistemas, los eritrocitos no se vieron afectados, encontrándose dentro de la normalidad de acuerdo con los valores de otros estudios (Pérez et al. 2015; Tiwari et al. 2011; Byrom et al. 2010). A pesar de ser coherentes con los valores bibliográficos se le dio especial importancia a la comparación con los animales control y, de acuerdo con estos datos, se pudo descartar una posible anemia provocada por la administración de los sistemas a los animales.

En el caso del volumen corpuscular medio (MCV), se trata de un índice del tamaño de los eritrocitos, esta alteración está relacionada con un cambio en la osmolaridad de los mismos, afectando a la cantidad de agua presente en las células o con una hiper o hiponatremia (aumento o disminución del ion sodio en la sangre) (McMullin 2008). Los valores de este parámetro están alterados en distintas enfermedades como la diabetes o en pacientes con riesgo de enfermedad cardiovascular (Philipsen & Madsen 2015).

De acuerdo con los valores obtenidos del volumen corpuscular medio, no existen alteraciones con respecto a las ratas control por lo que se descarta un aumento de tamaño de los eritrocitos y, por tanto, una alteración del contenido acuoso de la sangre o de iones capaces de interaccionar con las nanopartículas electrostáticamente como es el caso del sodio. También es posible descartar posibles interacciones electrostáticas de las nanopartículas con los eritrocitos que presentan una carga superficial negativa debida al ácido siálico situado en el glicocáliz (Z. Liu et al. 2012) y que se ha demostrado en estudios previos con productos de degradación del quitosano que conllevaban la agregación y daño de los eritrocitos (Fernandes et al. 2008). La concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM) y la hemoglobina corpuscular media (MCH) se relacionan con estos parámetros, y al igual que ocurría con ellos no se observaron alteraciones de los mismos.

Con todos estos datos, podría descartarse una posible alteración de la línea celular roja de la sangre debida a la administración de las nanopartículas, como si se ha observado en otros estudios en los que se administraban nanopartículas de óxido de titanio (Ghosh et al. 2013).

Los leucocitos, también conocidos como células inflamatorias o células blancas, son células del sistema inmune cuya función es la defensa del organismo frente a infecciones y materiales exógenos. Los leucocitos se clasifican en función de la estructura de su núcleo de forma que pueden ser mononucleares (linfocitos y monocitos) o polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos y basófilos) (Saraswat & Arya 2014).

El recuento de estas células es una herramienta que permite conocer si se ha producido una alteración del sistema inmune. Un número bajo de leucocitos, conocido como leucopenia, se encuentra relacionado con diferentes infecciones como por ejemplo la salmonelosis, en las que la membrana de estas células se ve destruida por la acción del sistema del complemento. Un aumento del número de leucocitos puede relacionarse tanto con infecciones por microorganismos como con enfermedades de tipo autoinmune (Chavakis 2012).

En los resultados se observa cómo existen diferencias significativas nueve días postadministración de las composiciones C20/A80 y C80/A20. El aumento de los leucocitos parece indicar que sí existe una respuesta del organismo frente a las nanopartículas al reconocerlas como un agente extraño. Este reconocimiento parece carecer de gravedad ya que los valores de leucocitos vuelven a recuperar la normalidad tras 30 días de tratamiento.

Los valores obtenidos para los linfocitos a lo largo del tratamiento, indican que no existe ninguna diferencia significativa con respecto a los valores de los animales control. Por tanto, la alteración encontrada a los 9 días en los valores de leucocitos, no pueden deberse a esta población. En este sentido, Ya-ke Liu y col. demostraron en estudios realizados in vitro la posible implicación de los monocitos en el tratamiento con nanopartículas de cobalto (Y. K. Liu et al. 2015), por lo que la alteración de los leucocitos observada puede deberse a la modificación de esa población.

Las plaquetas son pequeños fragmentos celulares originados a partir de los megacarioblastos en la médula ósea e implicados en la homeostasis sanguínea. Un aumento descontrolado de los mismos conlleva la producción de trombos que ponen en peligro al individuo, de la misma forma que una disminución de las mismas puede producir hemorragias

que también afecten a su salud (Matowicka-karna 2016). A pesar de esta actividad principal homeostática, son cada vez más los estudios que demuestran su papel efector y modulador en la respuesta inmune, siendo capaces de reconocer, secuestrar y matar patógenos además de reclutar a los leucocitos y favorecer su respuesta a organismos externos (Paniccia et al. 2015) (Jenne & Kubes 2015).

Esto hace que estas estructuras sean capaces de interaccionar con las nanopartículas como demuestran estudios como el de Corbalan y colaboradores en el que se demuestra que las nanopartículas de sílice están implicadas en la agregación de plaquetas (Jose Corbalan et al. 2012; Bihari et al. 2010). Es por ello que la medida de las plaquetas es un parámetro importante para determinar si existe riesgo de formación de trombos tras la administración de los nanosistemas. Como se puede observar en los resultados, los valores del recuento plaquetario obtenido en los análisis ( $677-910 \times 10^3 / \mu\text{L}$ ), concuerdan con los obtenidos en otros estudios ( $436-1018 \times 10^3 / \mu\text{L}$ ) (Hernán & Quiceno 2009), además de encontrarse dentro de la normalidad con respecto a los controles.

Existen estudios que relacionan la interacción entre las partículas y las plaquetas en función de la rugosidad de la superficie de estas partículas. Hay que tener en cuenta que un mayor tamaño de estas nanopartículas (mayor de  $2 \mu\text{m}$ , que es la dimensión de las plaquetas) aumenta la superficie de contacto y, por tanto, la posibilidad de interacción (L. Chen et al. 2011). Esto sería una de las razones por las que no se produce interacción entre los nanosistemas compuestos de quitosano y albúmina con las plaquetas ya que, tanto los tamaños obtenidos mediante microscopía como por DLS ponen de manifiesto tamaños inferiores a  $1 \mu\text{m}$  para todas las composiciones.

Con el fin de confirmar la hemocompatibilidad de las nanopartículas, se midieron componentes sanguíneos relacionados con la coagulación. La homeostasis y la coagulación de la sangre son procesos que impiden la pérdida de sangre y, por tanto, las hemorragias. Este proceso es regulado por factores secretados por células endoteliales de los vasos sanguíneos y por las plaquetas y proteínas plasmáticas de la sangre (Fröhlich 2016). Esto significa que una alteración de estas proteínas y sus interacciones puede tener como consecuencia una disminución de la homeostasis pudiendo producirse hemorragias o un aumento que conlleve la formación de coágulos que pongan en peligro al individuo.

Por ello, se midieron parámetros involucrados en el proceso de la coagulación, tales como antitrombina III (AIII), fibrinógeno (Fbg) y tiempo de protrombina (TPT).

El fibrinógeno se trata de una glicoproteína plasmática que juega un papel principal en la cascada de la coagulación, donde es escindido por la trombina para formar un entramado de fibrina (Carling et al. 2016). Esta proteína exhibe una fuerte tendencia a adsorberse en varias superficies, mediando las interacciones con plaquetas y glóbulos rojos. Estas interacciones pueden tener como consecuencia trombogénesis y degradación de biomateriales utilizados en intervenciones como marcapasos o válvulas (Kubiak et al. 2016). De acuerdo con los estudios de Lundqvist y col. y con los de Patra y col., las características de esta proteína hacen que forme parte de la “proteincorona” que envuelve a las nanopartículas una vez incorporadas en el organismo (Patra et al. 2016; Lundqvist et al. 2008). El hecho de que el fibrinógeno presente cadenas aniónicas (Meh et al. 1996) tiene como resultado una posible interacción con las cadenas catiónicas del quitosano (Rao & Sharma 1997).

Los resultados obtenidos revelan cómo tras la administración de las nanopartículas, se produjo una disminución del fibrinógeno en plasma. Esto es consecuente con la formación de una “proteincorona” en torno a las nanopartículas por interacción del fibrinógeno con las cargas positivas del quitosano. Sin embargo, la formación de esta “proteincorona” a diferencia de lo que sucede en otros estudios (Nadesh et al. 2013), no estaría alterando la cascada de coagulación como queda reflejado en el resto de los parámetros analizados.

La antitrombina III es una glicoproteína cuya función es la inhibición de enzimas presentes en la cascada de la coagulación, como es el caso de la trombina (Ranucci 2002). La trombina actúa sobre el fibrinógeno favoreciendo la cascada de la coagulación, por tanto, la actividad de la antitrombina III tiene como consecuencia inhibir dicha cascada. Aunque la coagulación es necesaria, también se requieren mecanismos que inhiban este proceso de manera que no se favorezca la producción de trombos que puedan conllevar efectos negativos en la salud (Patnaik & Moll 2008).

Según los resultados obtenidos no se aprecia ninguna diferencia significativa entre los animales tratados y los controles, por lo que en principio se puede descartar que las nanopartículas afecten a la antitrombina III y, por tanto, aumenten la coagulación por inhibición de esta enzima.

El tercer parámetro evaluado fue el tiempo de protrombina (PT), este se define como el tiempo medido en segundos que tarda en activarse la trombina desde su forma inactiva (protrombina) mediante la acción del complejo protrombinasa (Tripodi et al. 2007).

De acuerdo con los resultados, sí se ve una pequeña afectación del tiempo de protrombina tras una semana de la administración de nanopartículas de composición C50/A50 y C80/A20, sin embargo, este aumento del tiempo de protrombina es inferior al 25 % con respecto al grupo control y, teniendo en cuenta los valores bibliográficos obtenidos para ratas Wistar de otros estudios, se encuentran dentro de la normalidad (H. Qi et al. 2013).

Los resultados obtenidos con respecto a la biocompatibilidad de las nanopartículas con la sangre de los animales, y a pesar de los cambios observados en los parámetros de coagulación mencionados previamente, mostraron que la administración de las tres formulaciones sintetizadas de nanopartículas no produjo un efecto apreciable de trombosis ni una complicación hematológica severa en ningún animal.

Una vez distribuidos los sistemas por el organismo a través de la sangre, pueden entrar en contacto con otros órganos. Debido a las funciones depurativas de los mismos y teniendo en cuenta su implicación en el metabolismo de fármacos, cabe pensar que los órganos que van a estar más en contacto con las nanopartículas serán el hígado y el riñón y, en menor medida, el bazo. Esto implica que es necesario realizar un estudio más exhaustivo de los efectos que pueden producir las nanopartículas en estos órganos (Elsaesser & Howard 2012; Pan et al. 2012).

En el caso del hígado los principales marcadores bioquímicos de daño hepático son las enzimas aspartato aminotransferasa (ASP), alanino aminotransferasa (ALT), estas enzimas se han visto alteradas en el caso de tratamiento con ciertas nanopartículas como son las de óxido de zinc (Pandurangan & Kim 2015). Otra de las enzimas que puede indicar la existencia de alteración hepática, es la fosfatasa alcalina (ALP), si bien no es exclusiva de hígado, por lo que en caso de existir alteración en la enzima necesitaríamos determinar la gammaglutamiltransferasa para confirmarlo. El tratamiento con los sistemas basados en quitosano y albúmina no revelaron ninguna alteración en los valores de los marcadores hepáticos. Así se obtuvieron unos valores de 57,49-95,55 U/L, 22,66-51,66 U/L y 31,79-60,81 U/L, para las enzimas AST, ALT y ALP respectivamente, que se encuentran dentro del rango normal observado por otros investigadores. Estos resultados parecen descartar un posible daño hepático producido por las nanopartículas.

En el caso de los riñones, se midieron tanto la creatinina como la urea en sangre para determinar un posible fallo renal. En el caso de la creatinina se obtuvieron valores elevados del marcador tras 21 días de tratamiento para la composición C50/A50 y tras 30 días para la

composición C80/A20, aunque estos valores parecen indicar una afectación renal ya que se encuentran elevados con respecto al grupo control. Sin embargo, al compararlos con los valores bibliográficos estos datos se encuentran dentro del intervalo normal. Además, en el caso de la composición C50/A50 tras 30 días de tratamiento, los niveles de creatinina vuelven a disminuir llegando a los valores iniciales. Por tanto, se podría pensar que se produciría una adecuación por parte del riñón a la presencia de las nanopartículas.

En el caso de la urea en sangre (BUN) se observa un pequeño incremento 21 días post-administración de la composición C80/A20, este valor, además de encontrarse dentro de los rangos normales, vuelve a disminuir tras 30 días de la administración de los sistemas.

Con los datos obtenidos en los estudios de marcadores metabólicos se podría descartar una afectación tanto hepática como renal debida a la administración de los nanosistemas.

Teniendo en cuenta que nuestras partículas son capaces de interactuar con proteínas como el fibrinógeno, cabría pensar que también puedan hacerlo con otras proteínas como las opsoninas. Estas proteínas aumentan la internalización celular de las nanopartículas dirigiéndolas al retículo endoplásmico (RES) (Tiwari et al. 2011; Aggarwal et al. 2009), de forma que tienden a acumularse en el retículo endoplásmico de órganos como hígado y bazo (Aggarwal et al. 2009), por lo que es fundamental estudiar el posible efecto que tienen sobre las especies reactivas de oxígeno en las células de dichos órganos. Es por esto por lo que en el caso de los tejidos también se realizaron estudios de estrés oxidativo, de manera que se pretende determinar un posible aumento de alguna de estas especies que sea capaz de producir alteraciones y el consecuente daño celular, de manera que se midió el contenido total de glutatión (GSSG/GSH) y la actividad de diversas enzimas antioxidantes como son superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión reductasa (GSSG-R). Como demuestran los resultados tanto la composición C20/A80 como C80/A20 afectaron al estrés oxidativo hepático, sin embargo, no lo hicieron de la misma manera ya que en ambos casos las especies que aumentan su concentración no son las mismas, esto puede explicarse como que la respuesta celular a un posible daño producido por agentes exógenos no depende de la composición del agente exógeno ya que ambas composiciones no se van a metabolizar por las mismas vías ni interactuarán con las mismas proteínas. De la misma manera se determinó que en el caso del riñón, las composiciones que afectaban al hígado no desencadenaban ninguna respuesta, esto puede deberse o bien a que no afectan de la misma manera a los distintos órganos o a que la acumulación de las nanopartículas en los órganos también

depende de su composición. Tampoco el bazo se vio afectado de la misma manera que lo hicieron el resto de órganos.

Como se discutió en el caso del estrés oxidativo en los cultivos celulares de células tumorales, la incorporación celular de un agente externo provoca una respuesta para disminuir las posibles especies reactivas de oxígeno generadas, tanto la superóxido dismutasa como la catalasa y la glutatión reductasa son, en realidad, enzimas protectoras de la célula, de forma que un aumento de su actividad no tiene por qué relacionarse con daño de las estructuras sino con un mecanismo eficiente de protección frente a agentes externos.

De acuerdo con esta última teoría y para asegurar que no se ha producido realmente daño celular, y que las estructuras de los órganos más susceptibles de daño se mantienen intactas, se realizaron estudios histológicos en los que se pudiese apreciar una afectación de la morfología celular y de las estructuras tisulares. Este último estudio permitió asegurar la ausencia de daño en hígado, riñón y bazo, observándose las estructuras propias de los mismos y una morfología celular sin ninguna alteración. Tampoco se pudo apreciar la presencia de nanopartículas retenidas en estos órganos, por lo que se podría confirmar que tras un mes de tratamiento con los nanosistemas y teniendo en cuenta las características de los mismos, parecen haberse degradado.

Por todo ello, se puede decir que se ha confirmado el posible uso de estos sistemas para la liberación controlada de fármacos, concretamente de la doxorubicina, abriendo las puertas a una nueva forma de administración del antineoplásico.





A decorative pattern of interconnected circles and lines, resembling a molecular or network structure, is positioned on the right side of the page. The circles are in shades of red, green, and grey, and the lines are thin and grey.

# CONCLUSIONES



---

## Conclusiones

Por todo lo anteriormente expuesto, podemos afirmar que se ha conseguido el Objetivo General del presente trabajo de investigación, como queda reflejado con las conclusiones que se muestran a continuación.

- El método de entrecruzamiento iónico ha permitido la síntesis de las nanopartículas de quitosano y albúmina en diferentes proporciones. Todas las composiciones estudiadas tienen un tamaño nanométrico, morfología esférica y superficie lisa. La funcionalización de las nanopartículas con ácido fólico se consiguió para todos los sistemas; la caracterización de los mismos demostró un ligero aumento del tamaño, aunque se mantiene el rango nanométrico, la superficie lisa y la morfología esférica.
- La inclusión de doxorubicina se llevó a cabo de manera satisfactoria, si bien la eficiencia de incorporación depende de la composición polimérica (34-71%). Las partículas vectorizadas con ácido fólico encapsulan el fármaco con una eficiencia superior a las no vectorizadas (46-81%). Parte del fármaco queda en la zona más superficial de las nanopartículas, en ambos sistemas.
- La liberación de doxorubicina desde las nanopartículas *in vitro*, simulando ambientes fisiológicos, para las distintas composiciones de nanopartículas, estén o no vectorizadas, presentan un efecto *burst* en los primeros minutos (10 minutos). La liberación máxima está comprendido entre las 22,5 y 47 horas en función de la composición polimérica para los nanosistemas no vectorizados. La unión del ácido fólico provoca una disminución en el tiempo de máxima liberación (4 y 27,5 horas). En ambos casos, la liberación se produce en dos etapas, una etapa más rápida y otra más lenta, en esta última, son importantes las interacciones entre la doxorubicina y los componentes de las nanopartículas, lo que justifica que en algunos casos no se produzca la liberación total del fármaco.
- Los estudios de incorporación de las nanopartículas al interior celular, han demostrado una internalización de todas las nanopartículas independientemente de la línea celular. La funcionalización de los sistemas ha incrementado de los mismos por su

interacción con los receptores de folato de la superficie celular, lo que se hace evidente al bloquearlos.

- Todos los nanosistemas son citocompatibles. La viabilidad celular es dependiente de la composición de la nanopartícula, disminuyendo cuando aumenta la proporción de quitosano. La presencia de doxorrubicina en las nanopartículas, disminuye la viabilidad celular, lo que es indicativo de que el fármaco sigue siendo eficaz. Además, queda patente que gracias a estos sistemas puede vencerse la resistencia a fármacos, sobre todo cuando están funcionalizados.
- La administración intravenosa de las nanopartículas sin fármaco y sin vectorizar en ratas *Wistar*, no produce alteraciones reseñables ni a nivel hematológico ni hepático y renal. La presencia en el organismo de las nanopartículas, genera radicales libres como queda reflejado en las modificaciones de las defensas antioxidantes observadas. Podemos considerar que no existen consecuencias negativas tras la administración de los sistemas a los animales de experimentación.

An abstract graphic on the right side of the page, consisting of a network of interconnected circles (nodes) in various shades of red, green, and grey, set against a light grey background. The nodes are of different sizes and are connected by thin, light grey lines, creating a complex, branching structure that resembles a molecular model or a network diagram.

# BIBLIOGRAFÍA



# Bibliografía

- Abe, Masakazu, Yasuyuki Hirashima, Yuka Kasamatsu, Nobuhiro Kado, Satomi Komeda, Shiho Kuji, Aki Tanaka, et al. 2016. "Efficacy and Safety of Olanzapine Combined with Aprepitant, Palonosetron, and Dexamethasone for Preventing Nausea and Vomiting Induced by Cisplatin-Based Chemotherapy in Gynecological Cancer: KCOG-G1301 Phase II Trial." *Supportive Care in Cancer* 24 (2): 675–82. doi:10.1007/s00520-015-2829-z.
- Aebi, H. 1984. "Catalase in Vitro . Methods in Enzymology." *Methods in Enzymology* 105 (105): 121 –126.
- Aggarwal, Parag, Jennifer B. Hall, Christopher B. McLeland, Marina A. Dobrovolskaia, and Scott E. McNeil. 2009. "Nanoparticle Interaction with Plasma Proteins as It Relates to Particle Biodistribution, Biocompatibility and Therapeutic Efficacy." *Advanced Drug Delivery Reviews*. doi:10.1016/j.addr.2009.03.009.
- Agnihotri, Sunil A, Nadagouda N Mallikarjuna, and Tejraj M Aminabhavi. 2004. "Recent Advances on Chitosan-Based Micro- and Nanoparticles in Drug Delivery B." *Journal of Controlled Release* 100: 5–28. doi:10.1016/j.jconrel.2004.08.010.
- Agrahari, Vivek, and Bi-Botti C Youan. 2012. "Sensitive and Rapid HPLC Quantification of Tenofovir from Hyaluronic Acid-Based Nanomedicine." *AAPS PharmSciTech* 13 (1): 202–10. doi:10.1208/s12249-011-9735-6.
- Ahmed, Sameh, Naoya Kishikawa, Kaname Ohyama, Mitsuhiro Wada, Kenichiro Nakashima, and Naotaka Kuroda. 2009. "Selective Determination of Doxorubicin and Doxorubicinol in Rat Plasma by HPLC with Photosensitization Reaction Followed by Chemiluminescence Detection." *Talanta* 78 (1): 94–100. doi:10.1016/j.talanta.2008.10.043.
- Al-Abd, Ahmed M., Ki Y. Hong, Soo Chang Song, and Hyo Jeong Kuh. 2010. "Pharmacokinetics of Doxorubicin after Intratumoral Injection Using a



- Thermosensitive Hydrogel in Tumor-Bearing Mice.” *Journal of Controlled Release* 142 (1). Elsevier B.V.: 101–7. doi:10.1016/j.jconrel.2009.10.003.
- Alibolandi, Mona, Fatemeh Sadeghi, Khalil Abnous, Fatemeh Atyabi, Mohammad Ramezani, and Farzin Hadizadeh. 2015. “The Chemotherapeutic Potential of Doxorubicin-Loaded PEG-B-PLGA Nanopolymersomes in Mouse Breast Cancer Model.” *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 94: 521–31. doi:10.1016/j.ejpb.2015.07.005.
- Aljhni, R., F. Ibrahim, Y. C. Guillaume, and C. Andre. 2012. “Reactive Oxygen Species and Nitric Oxide Effect on the Steroid Hormone Binding with Serum Albumin.” *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 62. Elsevier B.V.: 129–34. doi:10.1016/j.jpba.2011.12.037.
- Andreucci, Elena, Paola Francica, Antony Fearn, Lesley-Ann Martin, Paola Chiarugi, Clare M Isacke, and Andrea Morandi. 2016. “Targeting the Receptor Tyrosine Kinase RET in Combination with Aromatase Inhibitors in ER Positive Breast Cancer Xenografts.” *Oncotarget* 7 (49): 80543–53. doi:10.18632/oncotarget.11826.
- Arteche Pujana, Maite, Leyre Pérez-Álvarez, Luis Carlos Cesteros Iturbe, and Issa Katime. 2013. “Biodegradable Chitosan Nanogels Crosslinked with Genipin.” *Carbohydrate Polymers* 94 (2). Elsevier Ltd.: 836–42. doi:10.1016/j.carbpol.2013.01.082.
- Ashikawa, Kazuhiro, Shishir Shishodia, Izabel Fokt, Waldemar Priebe, and Bharat B. Aggarwal. 2004. “Evidence That Activation of Nuclear Factor- $\kappa$ B Is Essential for the Cytotoxic Effects of Doxorubicin and Its Analogues.” *Biochemical Pharmacology* 67 (2): 353–64. doi:10.1016/j.bcp.2003.08.039.
- Ashrafi-Kooshk, Mohammad Reza, Farangis Ebrahimi, Samira Ranjbar, Sirous Ghobadi, Nastaran Moradi, and Reza Khodarahmi. 2015. “Comparative Studies on Drug Binding to the Purified and Pharmaceutical-Grade Human Serum Albumins: Bridging between Basic Research and Clinical Applications of Albumin.” *Biologicals* 43 (5): 333–43. doi:10.1016/j.biologicals.2015.07.003.

- Atli, Gülüzar, and Martin Grosell. 2016. "Characterization and Response of Antioxidant Systems in the Tissues of the Freshwater Pond Snail (*Lymnaea Stagnalis*) during Acute Copper Exposure." *Aquatic Toxicology* 176. Elsevier B.V.: 38–44. doi:10.1016/j.aquatox.2016.04.007.
- Baghbani, Fatemeh, Fathollah Moztarzadeh, Jamshid Aghazadeh Mohandesi, Fatemeh Yazdian, and Manijhe Mokhtari-Dizaji. 2016. "Novel Alginate-Stabilized Doxorubicin-Loaded Nanodroplets for Ultrasounic Theranosis of Breast Cancer." *International Journal of Biological Macromolecules* 93: 512–19. doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.09.008.
- Bahadori, Moslem, and Forozan Mohammadi. 2012. "Nanomedicine for Respiratory Diseases." *Tanaffos* 11 (4): 18–22. doi:10.1016/j.ejphar.2005.12.068.
- Bal, Wojciech, Magdalena Sokolowska, Ewa Kurowska, and Peter Fallner. 2013. "Binding of Transition Metal Ions to Albumin: Sites, Affinities and Rates." *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* 1830 (12): 5444–55. doi:10.1016/j.bbagen.2013.06.018.
- Barraud, Luc, Philippe Merle, Emilienne Soma, Lydie Lefrançois, Sylviane Guerret, Michèle Chevallier, Catherine Dubernet, Patrick Couvreur, Christian Trépo, and Ludmila Vitvitski. 2005. "Increase of Doxorubicin Sensitivity by Doxorubicin-Loading into Nanoparticles for Hepatocellular Carcinoma Cells in Vitro and in Vivo." *Journal of Hepatology* 42 (5): 736–43. doi:10.1016/j.jhep.2004.12.035.
- Bayraktar, Soley, Laura Amendola, Angelica M. Gutierrez-Barrera, Syed S. Hashmi, Chris Amos, Michael Gambello, Kaylene J. Ready, and Banu Arun. 2014. "Clinicopathologic Characteristics of Breast Cancer in BRCA-Carriers and Non-Carriers in Women 35 Years of Age or Less." *Breast* 23 (6). Elsevier Ltd: 770–74. doi:10.1016/j.breast.2014.08.010.
- Bazak, Remon, Mohamad Hourri, Samar El Achy, Serag Kamel, and Tamer Refaat. 2014. "Cancer Active Targeting by Nanoparticles: A Comprehensive Review of Literature." *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 141: 769–84. doi:10.1007/s00432-014-1767-3.

- Beerenwinkel, Niko, Roland F. Schwarz, Moritz Gerstung, and Florian Markowetz. 2015. "Cancer Evolution: Mathematical Models and Computational Inference." *Systematic Biology* 64 (1): e1–25. doi:10.1093/sysbio/syu081.
- Bihari, Peter, Martin Holzer, Marc Praetner, Janos Fent, Max Lerchenberger, Christoph A. Reichel, Markus Rehberg, Susan Lakatos, and Fritz Krombach. 2010. "Single-Walled Carbon Nanotubes Activate Platelets and Accelerate Thrombus Formation in the Microcirculation." *Toxicology* 269 (2–3). Elsevier Ireland Ltd: 148–54. doi:10.1016/j.tox.2009.08.011.
- Boer, Esther De, Lucia M A Crane, Marleen Van Oosten, Bert Van Der Vegt, Tineke Van Der Sluis, Paulien Kooijman, Philip S. Low, et al. 2015. "Folate Receptor-Beta Has Limited Value for Fluorescent Imaging in Ovarian, Breast and Colorectal Cancer." *PLoS ONE* 10 (8). doi:10.1371/journal.pone.0135012.
- Boström, M., D. R M Williams, and B. W. Ninham. 2001. "Specific Ion Effects: Why DLVO Theory Fails for Biology and Colloid Systems." *Physical Review Letters* 87 (16): 168103/1-168103/4. doi:10.1103/PhysRevLett.87.168103.
- Botchkarev, Vladimir A., and Andrey A. Sharov. 2016. "Modeling Chemotherapy-Induced Hair Loss: From Experimental Propositions toward Clinical Reality." *Journal of Investigative Dermatology* 136 (3). The Authors: 557–59. doi:10.1016/j.jid.2015.10.068.
- Bozzuto, Giuseppina, and Agnese Molinari. 2015. "Liposomes as Nanomedical Devices." *International Journal of Nanomedicine* 10: 975–99. doi:10.2147/IJN.S68861.
- Byrom, Michael J., Paul G. Bannon, Geoffrey H. White, and Martin K C Ng. 2010. "Animal Models for the Assessment of Novel Vascular Conduits." *Journal of Vascular Surgery* 52 (1). Elsevier Inc.: 176–95. doi:10.1016/j.jvs.2009.10.080.
- Cabezón, Itsaso, Gemma Manich, Raquel Martín-Venegas, Antoni Camins, Carme Pelegrí, and Jordi Vilaplana. 2015. "Trafficking of Gold Nanoparticles Coated with the 8D3 Anti-Transferrin Receptor Antibody at the Mouse Blood-Brain Barrier." *Molecular*

---

*Pharmaceutics* 12 (11): 4137–45. doi:10.1021/acs.molpharmaceut.5b00597.

Cacicedo, Maximiliano L., M. Cristina Castro, Ioannis Servetas, Loulouda Bosnea, Konstantina Boura, Panagiota Tsafrakidou, Agapi Dima, Antonia Terpou, Athanasios Koutinas, and Guillermo R. Castro. 2015. "Progress in Bacterial Cellulose Matrices for Biotechnological Applications." *Bioresource Technology*. doi:10.1016/j.biortech.2016.02.071.

Cao, Na, and Si Shen Feng. 2008. "Doxorubicin Conjugated to D-Alpha-Tocopheryl Polyethylene Glycol 1000 Succinate (TPGS): Conjugation Chemistry, Characterization, in Vitro and in Vivo Evaluation." *Biomaterials* 29 (28): 3856–65. doi:10.1016/j.biomaterials.2008.05.016.

Caraceni, Paolo, Manuel Tufoni, and Maria Elena Bonavita. 2013. "Clinical Use of Albumin." *Blood Transfusion* 11 (SUPPL. 4). doi:10.2450/2013.005s.

Carling, Malin S., Josef Zarhoud, Anders Jeppsson, Bengt I. Eriksson, and Helena Brisby. 2016. "Preoperative Plasma Fibrinogen Concentration, Factor XIII Activity, Perioperative Bleeding, and Transfusions in Elective Orthopaedic Surgery: A Prospective Observational Study." *Thrombosis Research* 139. Elsevier Ltd: 142–47. doi:10.1016/j.thromres.2016.01.001.

Carr, Miriam, Andrew J. S. Knox, David G. Lloyd, Daniela M. Zisterer, and Mary J. Meegan. 2016. "Development of the  $\beta$ -Lactam Type Molecular Scaffold for Selective Estrogen Receptor  $\alpha$  Modulator Action: Synthesis and Cytotoxic Effects in MCF-7 Breast Cancer Cells." *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 31 (sup3): 117–30. doi:10.1080/14756366.2016.1210136.

Casey, Stephanie C., Amedeo Amedei, Katia Aquilano, Asfar S. Azmi, Fabian Benencia, Dipita Bhakta, Alan E. Bilsland, et al. 2015. "Cancer Prevention and Therapy through the Modulation of the Tumor Microenvironment." *Seminars in Cancer Biology* 35. Elsevier Ltd: S199–223. doi:10.1016/j.semcancer.2015.02.007.

Cen, Juan, Li Zhang, Fangfang Liu, Feng Zhang, and Bian-Sheng Ji. 2016. "Long-Term

- Alteration of Reactive Oxygen Species Led to Multidrug Resistance in MCF-7 Cells.” *Oxid Med Cell Longev* 2016. Hindawi Publishing Corporation: 1–15. doi:10.1155/2016/7053451.
- Cerqueira, Brenda Brenner S, Annette Lasham, Andrew N. Shelling, and Raida Al-Kassas. 2015. “Nanoparticle Therapeutics: Technologies and Methods for Overcoming Cancer.” *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 97 (October). Elsevier B.V.: 140–51. doi:10.1016/j.ejpb.2015.10.007.
- Chae, Jung woo, Yi Ling Teo, Han Kiat Ho, Jaeyeon Lee, Hyun moon Back, Hwi yeol Yun, Mats O. Karlsson, Kwang il Kwon, and Alexandre Chan. 2016. “BSA and ABCB1 Polymorphism Affect the Pharmacokinetics of Sunitinib and Its Active Metabolite in Asian mRCC Patients Receiving an Attenuated Sunitinib Dosing Regimen.” *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 78 (3): 623–32. doi:10.1007/s00280-016-3104-9.
- Champier, Jacques, Francine Claustrat, Nicolas Nazaret, Michelle Fèvre Montange, and Bruno Claustrat. 2012. “Folate Depletion Changes Gene Expression of Fatty Acid Metabolism, DNA Synthesis, and Circadian Cycle in Male Mice.” *Nutrition Research* 32 (2): 124–32. doi:10.1016/j.nutres.2011.12.012.
- Chang, Esther H., Joe B. Harford, Michael A W Eaton, Patrick M. Boisseau, Admire Dube, Rose Hayeshi, Hulda Swai, and Dong Soo Lee. 2015. “Nanomedicine: Past, Present and Future - A Global Perspective.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 468 (3). Elsevier: 511–17. doi:10.1016/j.bbrc.2015.10.136.
- Chargari, Cyrus, Karyn A. Goodman, Ibrahima Diallo, Jean Baptiste Guy, Chloe Rancoule, Jean Marc Cosset, Eric Deutsch, and Nicolas Magne. 2016. “Risk of Second Cancers in the Era of Modern Radiation Therapy: Does the Risk/benefit Analysis Overcome Theoretical Models?” *Cancer and Metastasis Reviews* 35 (2). Cancer and Metastasis Reviews: 277–88. doi:10.1007/s10555-016-9616-2.
- Chaudhury, K, V Kumar, J Kandasamy, and S RoyChoudhury. 2014. “Regenerative Nanomedicine: Current Perspectives and Future Directions.” *International Journal of Nanomedicine* 9: 4153–67. doi:10.2147/IJN.S45332.

- Chavakis, Triantafyllos. 2012. "Leucocyte Recruitment in Inflammation and Novel Endogenous Negative Regulators Thereof." *European Journal of Clinical Investigation* 42 (6): 686–91. doi:10.1111/j.1365-2362.2012.02677.x.
- Chen, Chien Yu, Nai Yu Liu, Hui Chang Lin, Chih Yu Lee, Chin Chuan Hung, and Chih Shiang Chang. 2016. "Synthesis and Bioevaluation of Novel Benzodipyrone Derivatives as P-Glycoprotein Inhibitors for Multidrug Resistance Reversal Agents." *European Journal of Medicinal Chemistry* 118. Elsevier Masson SAS: 219–29. doi:10.1016/j.ejmech.2016.03.070.
- Chen, Li, Dong Han, and Lei Jiang. 2011. "On Improving Blood Compatibility: From Bioinspired to Synthetic Design and Fabrication of Biointerfacial Topography at Micro/nano Scales." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 85 (1). Elsevier B.V.: 2–7. doi:10.1016/j.colsurfb.2010.10.034.
- Cheruvallath, Vandana K., Christopher M. Riley, Sunanda R. Narayanan, Siegfried Lindenbaum, and John H. Perrin. 1996. "The Effect of Octanoic Acid on the Binding of the Enantiomers of Ibuprofen and Naproxen to Human Serum Albumin: A Chromatographic Implication." *Pharmaceutical Research* 13 (1): 173–78. doi:10.1023/A:1016066325476.
- Croteau, David, Scott Letendre, Brookie M. Best, Ronald J. Ellis, Sheila Breidinger, David Clifford, Ann Collier, et al. 2010. "Total Raltegravir Concentrations in Cerebrospinal Fluid Exceed the 50-Percent Inhibitory Concentration for Wild-Type HIV-1." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54 (12): 5156–60. doi:10.1128/AAC.00507-10.
- Degand, T, E Monnet, F Durand, E Grandclement, P Ichai, S Borot, C R Qualls, et al. 2015. "Assessment of Adrenal Function in Patients with Acute Hepatitis Using Serum Free and Total Cortisol." *Digestive and Liver Disease* 47 (9): 783–89. doi:10.1016/j.dld.2015.05.016.
- Deng, Wenping, Lei Shen, Xiu Wang, Chunlei Yang, Jinghua Yu, Mei Yan, and Xianrang Song. 2016. "Using Carbon Nanotubes-Gold Nanocomposites to Quench Energy from Pinnate Titanium Dioxide Nanorods Array for Signal-on Photoelectrochemical

- Aptasensing." *Biosensors and Bioelectronics* 82. Elsevier: 132–39. doi:10.1016/j.bios.2016.04.007.
- Desantis, Carol E, Stacey A Fedewa, Ann Goding Sauer, Joan L Kramer, Robert A Smith, and Ahmedin Jemal. 2016. "Breast Cancer Statistics , 2015 : Convergence of Incidence Rates Between Black and White Women." *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 66 (1): 31–42. doi:10.3322/caac.21320.
- Ding, Luna, Timothy Lee, and Chi Hwa Wang. 2005. "Fabrication of Monodispersed Taxol-Loaded Particles Using Electrohydrodynamic Atomization." *Journal of Controlled Release* 102 (2): 395–413. doi:10.1016/j.jconrel.2004.10.011.
- Dreis, S., F. Rothweiler, M. Michaelis, J. Cinatl, J. Kreuter, and K. Langer. 2007. "Preparation, Characterisation and Maintenance of Drug Efficacy of Doxorubicin-Loaded Human Serum Albumin (HSA) Nanoparticles." *International Journal of Pharmaceutics* 341 (1–2): 207–14. doi:10.1016/j.ijpharm.2007.03.036.
- Driver, Brandon R., Roberto Barrios, Yimin Ge, Abida Haque, David Tacha, and Philip T. Cagle. 2016. "Folate Receptor a Expression Level Correlates with Histologic Grade in Lung Adenocarcinoma." *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 140 (7): 682–85. doi:10.5858/arpa.2015-0431-OA.
- Drozd, Ewa, Jolanta Krzysztoń-Russjan, Jadwiga Marczewska, Janina Drozd, Irena Bubko, Magda Bielak, Katarzyna Lubelska, et al. 2016. "Up-Regulation of Glutathione-Related Genes, Enzyme Activities and Transport Proteins in Human Cervical Cancer Cells Treated with Doxorubicin." *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie* 83: 397–406. doi:10.1016/j.biopha.2016.06.051.
- Du, Jiang Bo, Ying Cheng, Zeng Hui Teng, Meng Lei Huan, Miao Liu, Han Cui, Bang Le Zhang, and Si Yuan Zhou. 2016. "PH-Triggered Surface Charge Reversed Nanoparticle with Active Targeting to Enhance the Antitumor Activity of Doxorubicin." *Molecular Pharmaceutics* 13 (5): 1711–22. doi:10.1021/acs.molpharmaceut.6b00158.
- Duan, Jinghua, Heidi M. Mansour, Yangde Zhang, Xingming Deng, Yuxiang Chen, Jiwei

- Wang, Yifeng Pan, and Jinfeng Zhao. 2012. "Reversion of Multidrug Resistance by Co-Encapsulation of Doxorubicin and Curcumin in Chitosan/poly(butyl Cyanoacrylate) Nanoparticles." *International Journal of Pharmaceutics* 426 (1–2). Elsevier B.V.: 193–201. doi:10.1016/j.ijpharm.2012.01.020.
- El-Awady, Raafat, Ekram Saleh, Amna Hashim, Nehal Soliman, Alaa Dallah, Azza Elrasheed, and Ghada Elakraa. 2017. "The Role of Eukaryotic and Prokaryotic ABC Transporter Family in Failure of Chemotherapy." *Front Pharmacol* 7 (January): 1–15. doi:10.3389/fphar.2016.00535.
- Eloy, Josimar Oliveira, Marina Claro de Souza, Raquel Petrilli, Juliana Palma Abriata Barcellos, Robert J. Lee, and Juliana Maldonado Marchetti. 2014. "Liposomes as Carriers of Hydrophilic Small Molecule Drugs: Strategies to Enhance Encapsulation and Delivery." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 123. Elsevier B.V.: 345–63. doi:10.1016/j.colsurfb.2014.09.029.
- Elsaesser, Andreas, and C. Vyvyan Howard. 2012. "Toxicology of Nanoparticles." *Advanced Drug Delivery Reviews* 64 (2). Elsevier B.V.: 129–37. doi:10.1016/j.addr.2011.09.001.
- Fernandes, Joao C, Peter Eaton, Henrique Nascimento, Luis Belo, Susana Rocha, Rui Vitorino, Francisco Amado, et al. 2008. "Effects of Chitooligosaccharides on Human Red Blood Cell Morphology and Membrane Protein Structure." *Biomacromolecules* 9 (12): 3346–52. doi:10.1021/bm800622f.
- Fertah, Mohamed, Ahmed Belfkira, El montassir Dahmane, Moha Taourirte, and François Brouillette. 2014. "Extraction and Characterization of Sodium Alginate from Moroccan Laminaria Digitata Brown Seaweed." *Arabian Journal of Chemistry*. doi:10.1016/j.arabjc.2014.05.003.
- Fröhlich, Eleonore. 2016. "Action of Nanoparticles on Platelet Activation and Plasmatic Coagulation." *Current Medicinal Chemistry* 23: 408–30.
- Fulbright, Joy Marie, Daniela E. Egas-Bejar, Winston W. Huh, and Joya Chandra. 2015. "Analysis of Redox and Apoptotic Effects of Anthracyclines to Delineate a



- Cardioprotective Strategy." *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 76 (6). Springer Berlin Heidelberg: 1297–1307. doi:10.1007/s00280-015-2879-4.
- Fung, Edward K, Sarah M Cheal, Shoaib B Fareedy, Blesida Punzalan, Volkan Beylergil, Jawaria Amir, Sandhya Chalasani, et al. 2016. "Targeting of Radiolabeled J591 Antibody to PSMA-Expressing Tumors: Optimization of Imaging and Therapy Based on Non-Linear Compartmental Modeling." *EJNMMI Research* 6 (1). EJNMMI Research: 7. doi:10.1186/s13550-016-0164-0.
- Gámiz-González, M. A., A. E. Piskin, C. Pandis, C. Chatzimanolis-Moustakas, A. Kyritsis, B. Marí, J. L Gómez Ribelles, and A. Vidaurre. 2015. "Determining the Influence of N-Acetylation on Water Sorption in Chitosan Films." *Carbohydrate Polymers* 133. Elsevier Ltd.: 110–16. doi:10.1016/j.carbpol.2015.07.020.
- Gasser, Martin, and Ana Maria Waaga-Gasser. 2016. "Therapeutic Antibodies in Cancer Therapy." *Advances in Experimental Medicine and Biology* 917: 95–120. doi:10.1007/978-3-319-32805-8\_6.
- Georg Jensen, M., C. Pedersen, M. Kristensen, G. Frost, and A. Astrup. 2013. "Review: Efficacy of Alginate Supplementation in Relation to Appetite Regulation and Metabolic Risk Factors: Evidence from Animal and Human Studies." *Obesity Reviews* 14 (2): 129–44. doi:10.1111/j.1467-789X.2012.01056.x.
- Gharpure, Kshipra M., Sherry Y. Wu, Chun Li, Gabriel Lopez-Berestein, and Anil K. Sood. 2015. "Nanotechnology: Future of Oncotherapy." *Clinical Cancer Research* 21 (14): 3121–30. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-1189.
- Ghosh, Manosij, Anirban Chakraborty, and Anita Mukherjee. 2013. "Cytotoxic, Genotoxic and the Hemolytic Effect of Titanium Dioxide (TiO<sub>2</sub>) Nanoparticles on Human Erythrocyte and Lymphocyte Cells in Vitro." *Journal of Applied Toxicology* 33 (10): 1097–1110. doi:10.1002/jat.2863.
- Ghuman, Jamie, Patricia A. Zunszain, Isabelle Petitpas, Ananyo A. Bhattacharya, Masaki Otagiri, and Stephen Curry. 2005. "Structural Basis of the Drug-Binding Specificity of

- Human Serum Albumin." *Journal of Molecular Biology* 353 (1): 38–52. doi:10.1016/j.jmb.2005.07.075.
- Gong, Hua, Rui Peng, and Zhuang Liu. 2013. "Carbon Nanotubes for Biomedical Imaging: The Recent Advances." *Advanced Drug Delivery Reviews* 65 (15). Elsevier B.V.: 1951–63. doi:10.1016/j.addr.2013.10.002.
- Goodwin, Jonathan, Katsuya Yachi, Masaki Nagane, Hironobu Yasui, Yusuke Miyake, Osamu Inanami, Andrey A. Bobko, Valery V. Khramtsov, and Hiroshi Hirata. 2014. "In Vivo Tumour Extracellular pH Monitoring Using Electron Paramagnetic Resonance: The Effect of X-Ray Irradiation." *NMR in Biomedicine* 27 (4): 453–58. doi:10.1002/nbm.3081.
- Gundogdu, Evren, and Aysu Yurdasiper. 2014. "Drug Transport Mechanism of Oral Antidiabetic Nanomedicines." *International Journal of Endocrinology and Metabolism* 12 (1): 1–5. doi:10.5812/ijem.8984.
- Hammond, J B, and N J Kruger. 1988. "The Bradford Method for Protein Quantitation." *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 3: 25–32. doi:10.1385/0-89603-126-8:25.
- Hanna, Amy D, Alex Lam, Steffi Tham, Angela F Dulhunty, and Nicole A Beard. 2014. "Adverse Effects of Doxorubicin and Its Metabolic Product on Cardiac RyR2 and SERCA2A." *Molecular Pharmacology* 86 (October): 438–49. doi:10.1124/mol.114.093849.
- Harper, B. Allison, Shai Barbut, Loong Tak Lim, and Massimo F. Marcone. 2014. "Effect of Various Gelling Cations on the Physical Properties of 'Wet' Alginate Films." *Journal of Food Science* 79 (4): 562–67. doi:10.1111/1750-3841.12376.
- He, Yifeng, Qiuqing Zhu, Mo Chen, Qihong Huang, and Wenjing Wang. 2016. "The Changing 50 % Inhibitory Concentration ( IC 50 ) of Cisplatin : A Pilot Study on the Artifacts of the MTT Assay and the Precise Measurement of Density-Dependent Chemoresistance in Ovarian Cancer." *Oncotarget* 7 (43). doi:10.18632/oncotarget.12223.

- Hermansson, Malte. 1999. "The DLVO Theory in Microbial Adhesion." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 14 (1-4): 105-19. doi:10.1016/S0927-7765(99)00029-6.
- Hernán, Víctor, and Arcila Quiceno. 2009. "Comparación de Los Valores de Referencia Hematológicos En Ratas Wistar / UIS ( Rattus Norvergicus ) Con Parámetros Establecidos En Laboratorios de Altos Estándares," no. 12: 45-51.
- Holliday, Deborah L, and Valerie Speirs. 2011. "Choosing the Right Cell Line for Breast Cancer Research." *Breast Cancer Research : BCR* 13: 215. doi:10.1186/bcr2889.
- Horne, Steven D., Sarah A. Pollick, and Henry H Q Heng. 2015. "Evolutionary Mechanism Unifies the Hallmarks of Cancer." *International Journal of Cancer* 136 (9): 2012-21. doi:10.1002/ijc.29031.
- Hosseinnejad, Mahmoud, and Seid Mahdi Jafari. 2016. "Evaluation of Different Factors Affecting Antimicrobial Properties of Chitosan." *International Journal of Biological Macromolecules*. doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.01.022.
- Hu, Fu Qiang, Xiu ling Wu, Yong Zhong Du, Jian You, and Hong Yuan. 2008. "Cellular Uptake and Cytotoxicity of Shell Crosslinked Stearic Acid-Grafted Chitosan Oligosaccharide Micelles Encapsulating Doxorubicin." *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 69 (1): 117-25. doi:10.1016/j.ejpb.2007.09.018.
- Huang, Jing, Lihong Bu, Jin Xie, Kai Chen, Zhen Cheng, Xingguo Li, and Xiaoyuan Chen. 2010. "Effects of Nanoparticle Size on Cellular Uptake and Liver MRI with Polyvinylpyrrolidone-Coated Iron Oxide Nanoparticles." *ACS Nano*. doi:10.1021/nn101643u.
- Huang, Yue, Eva Hemmer, Federico Rosei, and Fiorenzo Vetrone. 2016. "Multifunctional Liposome Nanocarriers Combining Upconverting Nanoparticles and Anticancer Drugs." *Journal of Physical Chemistry B* 120 (22): 4992-5001. doi:10.1021/acs.jpcc.6b02013.
- Iijima, Sumio. 1991. "Helical Microtubules of Graphitic Carbon." *Nature* 354: 56-58.

doi:10.1038/350055a0.

- Ijpma, I., R. J. Renken, G. J. ter Horst, and A. K L Reyners. 2015. "Metallic Taste in Cancer Patients Treated with Chemotherapy." *Cancer Treatment Reviews* 41 (2). Elsevier Ltd: 179–86. doi:10.1016/j.ctrv.2014.11.006.
- Inamura, Kentaro, Mingyang Song, Seungyoun Jung, Reiko Nishihara, Mai Yamauchi, Paul Lochhead, Zhi Rong Qian, et al. 2016. "Prediagnosis Plasma Adiponectin in Relation to Colorectal Cancer Risk according to KRAS Mutation Status." *Journal of the National Cancer Institute* 108 (4): 1–10. doi:10.1093/jnci/djv363.
- Ionescu, Ana Maria, Miguel Alaminos, Juan de la Cruz Cardona, Juan de Dios García-López Durán, Miguel González-Andrades, Razvan Ghinea, Antonio Campos, Enrique Hita, and María del Mar Pérez. 2011. "Investigating a Novel Nanostructured Fibrin-Agarose Biomaterial for Human Cornea Tissue Engineering: Rheological Properties." *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 4 (8). Elsevier Ltd: 1963–73. doi:10.1016/j.jmbbm.2011.06.013.
- Jain, Ak, a Massey, H Yusuf, Dm McDonald, and Vl Kett. 2015. "Development of Polymeric – Cationic Peptide Composite Nanoparticles , a Nanoparticle-in- Nanoparticle System for Controlled Gene Delivery." *International Journal of Nanomedicine* 10: 7183–96.
- Jain, Keerti, Prashant Kesharwani, Umesh Gupta, and N. K. Jain. 2010. "Dendrimer Toxicity: Let's Meet the Challenge." *International Journal of Pharmaceutics* 394 (1–2). Elsevier B.V.: 122–42. doi:10.1016/j.ijpharm.2010.04.027.
- Jenne, Craig N, and Paul Kubes. 2015. "Platelets in Inflammation and Infection." *Platelets* 26 (4): 286–92. doi:10.3109/09537104.2015.1010441.
- Jeong, Ki-jae, Younseong Song, Hye-ri Shin, Ji Eun Kim, Jeonghyo Kim, and Jaebeom Lee. 2016. "In Vivo Study on the Biocompatibility of Chitosan- Hydroxyapatite Film Depending on Degree of Deacetylation." *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 1–25. doi:10.1002/jbm.a.35993.

- Jose Corbalan, J., Carlos Medina, Adam Jacoby, Tadeusz Malinski, and Marek W. Radomski. 2012. "Amorphous Silica Nanoparticles Aggregate Human Platelets: Potential Implications for Vascular Homeostasis." *International Journal of Nanomedicine* 7: 631–39. doi:10.2147/IJN.S28293.
- Juenet, Maya, Mariana Varna, Rachida Aid-Launais, Cédric Chauvierre, and Didier Letourneur. 2015. "Nanomedicine for the Molecular Diagnosis of Cardiovascular Pathologies." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 468 (3): 476–84. doi:10.1016/j.bbrc.2015.06.138.
- Junyaprasert, Varaporn Buraphacheep, Sirithip Dhanahiranpruk, Jiraphong Suksiriworapong, Kittisak Sripha, and Primchanien Moongkarndi. 2015. "Enhanced Toxicity and Cellular Uptake of Methotrexate-Conjugated Nanoparticles in Folate Receptor-Positive Cancer Cells by Decorating with Folic Acid-Conjugated D-Tocopheryl Polyethylene Glycol 1000 Succinate." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 136. Elsevier B.V.: 383–93. doi:10.1016/j.colsurfb.2015.09.013.
- Kaaki, Karine, Katel Herve, Manuela Chiper, Andriy Shkilnyy, Martin Souce, Roland Benoit, Archibald Paillard, Pierre Dubois, Marie-louise Saboungi, and Igor Chourpa. 2012. "Magnetic Nanocarriers of Doxorubicin Coated with Poly ( Ethylene Glycol ) and Folic Acid : Relation between Coating Structure , Surface Properties , Colloidal Stability , and Cancer Cell Targeting." *Langmuir* 28 (2): 1496–1505.
- Kalomiraki, Marina, Kyriaki Thermos, and Nikos A. Chaniotakis. 2015. "Dendrimers as Tunable Vectors of Drug Delivery Systems and Biomedical and Ocular Applications." *International Journal of Nanomedicine* 11: 1–12. doi:10.2147/IJN.S93069.
- Kang, Ting, Mengyin Jiang, Di Jiang, Xingye Feng, Jianhui Yao, Qingxiang Song, Hongzhuan Chen, Xiaoling Gao, and Jun Chen. 2015. "Enhancing Glioblastoma-Specific Penetration by Functionalization of Nanoparticles with an Iron-Mimic Peptide Targeting Transferrin/Transferrin Receptor Complex." *Molecular Pharmaceutics* 12 (8): 2947–61. doi:10.1021/acs.molpharmaceut.5b00222.
- Kataoka, Hiromi, Yoshinori Mori, Takaya Shimura, Hirotada Nishie, Makoto Natsume, Hisato Mochizuki, Yoshikazu Hirata, et al. 2016. "A Phase II Prospective Study of the

- Trastuzumab Combined with 5-Weekly S-1 and CDDP Therapy for HER2-Positive Advanced Gastric Cancer.” *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 77 (5). Springer Berlin Heidelberg: 957–62. doi:10.1007/s00280-016-3013-y.
- Khaing, Zin Z., and Christine E. Schmidt. 2012. “Advances in Natural Biomaterials for Nerve Tissue Repair.” *Neuroscience Letters* 519 (2). Elsevier Ireland Ltd: 103–14. doi:10.1016/j.neulet.2012.02.027.
- Kim, Il Hyuk, Jung Hwan Park, In Woo Cheong, and Jung Hyun Kim. 2003. “Swelling and Drug Release Behavior of Tablets Coated with Aqueous Hydroxypropyl Methylcellulose Phthalate (HPMCP) Nanoparticles.” *Journal of Controlled Release* 89 (2): 225–33. doi:10.1016/S0168-3659(03)00089-0.
- Klokkevold, Perry R., Haruhisa Fukayama, Eric C. Sung, and Charles N. Bertolami. 1999. “The Effect of Chitosan (Poly-N-Acetyl Glucosamine) on Lingual Hemostasis in Heparinized Rabbits.” *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 57 (1): 49–52. doi:10.1016/S0278-2391(99)90632-8.
- Ko, Hsu-Feng, Charles Sfeir, and Prashant N Kumta. 2010. “Novel Synthesis Strategies for Natural Polymer and Composite Biomaterials as Potential Scaffolds for Tissue Engineering.” *Philosophical Transactions. Series A, Mathematical, Physical, and Engineering Sciences* 368 (1917): 1981–97. doi:10.1098/rsta.2010.0009.
- Kubiak, Katarzyna, Zbigniew Adamczyk, and Michał Cieśla. 2016. “Fibrinogen Adsorption Mechanisms at the Gold Substrate Revealed by QCM-D Measurements and RSA Modeling.” *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 139: 123–31. doi:10.1016/j.colsurfb.2015.11.052.
- Kundranda, M N, and J Niu. 2015. “Albumin-Bound Paclitaxel in Solid Tumors: Clinical Development and Future Directions.” *Drug Design, Development and Therapy* 9: 3767–77. doi:10.2147/DDDT.S88023 [doi].
- Kura, a U, P S Cheah, M Z Hussein, Z Hassan, T I Tengku Azmi, N F Hussein, and S Fakurazi. 2014. “Toxicity Evaluation of Zinc Aluminium Levodopa Nanocomposite via Oral

- Route in Repeated Dose Study.” *Nanoscale Res Lett* 9 (1): 261. doi:10.1186/1556-276X-9-261\r1556-276X-9-261 [pii].
- Kurosaki, Akira, Kosei Hasegawa, Tomomi Kato, Kenji Abe, Tatsuya Hanaoka, Akiko Miyara, Daniel J. O’Shannessy, et al. 2016. “Serum Folate Receptor Alpha as a Biomarker for Ovarian Cancer: Implications for Diagnosis, Prognosis and Predicting Its Local Tumor Expression.” *International Journal of Cancer* 138 (8): 1994–2002. doi:10.1002/ijc.29937.
- Lee, Robert J., and Philip S. Low. 1994. “Delivery of Liposomes into Cultured KB Cells via Folate Receptor-Mediated Endocytosis.” *Journal of Biological Chemistry* 269 (5): 3198–3204. doi:8106354.
- Letchford, Kevin, and Helen Burt. 2007. “A Review of the Formation and Classification of Amphiphilic Block Copolymer Nanoparticulate Structures: Micelles, Nanospheres, Nanocapsules and Polymersomes.” *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 65 (3): 259–69. doi:10.1016/j.ejpb.2006.11.009.
- Li, Hongchang, Yuqing Cheng, Yong Liu, and Bo Chen. 2016. “Fabrication of Folic Acid-Sensitive Gold Nanoclusters for Turn-on Fluorescent Imaging of Overexpression of Folate Receptor in Tumor Cells.” *Talanta* 158. Elsevier: 118–24. doi:10.1016/j.talanta.2016.05.038.
- Li, Lulu, Jin Tan, Yuyang Miao, Ping Lei, and Qiang Zhang. 2015. “ROS and Autophagy: Interactions and Molecular Regulatory Mechanisms.” *Cellular and Molecular Neurobiology* 35 (5). Springer US: 615–21. doi:10.1007/s10571-015-0166-x.
- Li, Pei-Shan, I. -Liang Lee, Wei-Lin Yu, Jui-Sheng Sun, Wann-Neng Jane, and Hsin-Hsin Shen. 2014. “A Novel Albumin-Based Tissue Scaffold for Autogenic Tissue Engineering Applications.” *Scientific Reports* 4: 1–7. doi:10.1038/srep05600.
- Li, Wei, Zhongyun Liu, Chengxia Li, Ning Li, Lei Fang, Jin Chang, and Jian Tan. 2016. “Radionuclide Therapy Using <sup>131</sup>I-Labeled Anti-Epidermal Growth Factor Receptor-Targeted Nanoparticles Suppresses Cancer Cell Growth Caused by EGFR

- Overexpression." *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 142 (3). Springer Berlin Heidelberg: 619–32. doi:10.1007/s00432-015-2067-2.
- Liu, Ya Ke, Jun Ye, Qing Lin Han, Ran Tao, Fan Liu, and Wei Wang. 2015. "Toxicity and Bioactivity of Cobalt Nanoparticles on the Monocytes." *Orthopaedic Surgery* 7 (2): 168–73. doi:10.1111/os.12180.
- Liu, Zonghua, Yanpeng Jiao, Tong Wang, Yuanming Zhang, and Wei Xue. 2012. "Interactions between Solubilized Polymer Molecules and Blood Components." *Journal of Controlled Release* 160 (1). Elsevier B.V.: 14–24. doi:10.1016/j.jconrel.2012.02.005.
- Lodhi, Gaurav, Yon Suk Kim, Jin Woo Hwang, Se Kwon Kim, You Jin Jeon, Jae Young Je, Chang Bum Ahn, Sang Ho Moon, Byong Tae Jeon, and Pyo Jam Park. 2014. "Chitooligosaccharide and Its Derivatives: Preparation and Biological Applications." *BioMed Research International* 2014. doi:10.1155/2014/654913.
- Lopes-Bastos, Bruno Miguel, Wen G. Jiang, and Jun Cai. 2016. "Tumour-Endothelial Cell Communications: Important and Indispensable Mediators of Tumour Angiogenesis." *Anticancer Research* 36 (3): 1119–26.
- Lording, Peter M. 2008. "Erythrocytes." *Veterinary Clinics of North America - Equine Practice* 24 (2): 225–37. doi:10.1016/j.cveq.2008.04.002.
- Lu, Yonghui, Shangcheng Xu, Haiyan Chen, Mindi He, Youcai Deng, Zhengwang Cao, Huifeng Pi, et al. 2016. "CdSe/ZnS Quantum Dots Induce Hepatocyte Pyroptosis and Liver Inflammation via NLRP3 Inflammasome Activation." *Biomaterials* 90: 27–39. doi:10.1016/j.biomaterials.2016.03.003.
- Lundqvist, Martin, Johannes Stigler, Giuliano Elia, Iseult Lynch, Tommy Cedervall, and Kenneth A Dawson. 2008. "Nanoparticle Size and Surface Properties Determine the Protein Corona with Possible Implications for Biological Impacts." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (38): 14265–70. doi:10.1073/pnas.0805135105.



- Ma, Xingmao, and Sarang Agarwal. 2016. "Adsorption of Emerging Ionizable Contaminants on Carbon Nanotubes: Advancements and Challenges." *Molecules* 21 (5). doi:10.3390/molecules21050628.
- Madjid, Mohammad, and Omid Fatemi. 2013. "Components of the Complete Blood Count as Risk Predictors for Coronary Heart Disease: In-Depth Review and Update." *Texas Heart Institute Journal* 40 (1): 17–29. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23467296> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3568280>.
- Mahmoodi, Nosrat O., Atefeh Ghavidast, and Najmeh Amirmahani. 2016. "A Comparative Study on the Nanoparticles for Improved Drug Delivery Systems." *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 162. Elsevier B.V.: 681–93. doi:10.1016/j.jphotobiol.2016.07.037.
- Manning, H. Charles, Nipun B. Merchant, A. Coe Foutch, John M. Virostko, Shelby K. Wyatt, Chirayu Shah, Eliot T. McKinley, et al. 2008. "Molecular Imaging of Therapeutic Response to Epidermal Growth Factor Receptor Blockade in Colorectal Cancer." *Clinical Cancer Research* 14 (22): 7413–22. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-0239.
- Martínez, A., R. Olmo, I. Iglesias, J. M. Teijón, and M. D. Blanco. 2014. "Folate-Targeted Nanoparticles Based on Albumin and Albumin/alginate Mixtures as Controlled Release Systems of Tamoxifen: Synthesis and in Vitro Characterization." *Pharmaceutical Research* 31 (1): 182–93. doi:10.1007/s11095-013-1151-z.
- Martino, Alberto Di, Michael Sittinger, and Makarand V. Risbud. 2005. "Chitosan: A Versatile Biopolymer for Orthopaedic Tissue-Engineering." *Biomaterials* 26 (30): 5983–90. doi:10.1016/j.biomaterials.2005.03.016.
- Matei, Daniela, Jeanne Schilder, Gregory Sutton, Susan Perkins, Tim Breen, Check Quon, and Carolyn Sidor. 2009. "Activity of 2 Methoxyestradiol (Panzem?? NCD) in Advanced, Platinum-Resistant Ovarian Cancer and Primary Peritoneal Carcinomatosis: A Hoosier Oncology Group Trial." *Gynecologic Oncology* 115 (1): 90–96. doi:10.1016/j.ygyno.2009.05.042.

- Matowicka-karna, Joanna. 2016. "Markery Zapalenia , Aktywacja Płytek Krwi I Zaburzenia Krzepnięcia W Chorobach Zapalnych Jelit Markers of Inflammation , Activation of Blood Platelets and Coagulation Disorders in Inflammatory Bowel Diseases," 305–12.
- McIntosh, Kyle, Curt Balch, and Amit K. Tiwari. 2016. "Tackling Multidrug Resistance Mediated by Efflux Transporters in Tumor-Initiating Cells." *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* 5255 (May): 17425255.2016.1179280. doi:10.1080/17425255.2016.1179280.
- McMullin, M. F. 2008. "The Classification and Diagnosis of Erythrocytosis." *International Journal of Laboratory Hematology* 30 (6): 447–59. doi:10.1111/j.1751-553X.2008.01102.x.
- Meel, Roy Van Der, Marcel H A M Fens, Pieter Vader, Wouter W. Van Solinge, Omolola Niola-Adefeso, and Raymond M. Schiffelers. 2014. "Extracellular Vesicles as Drug Delivery Systems: Lessons from the Liposome Field." *Journal of Controlled Release* 195. Elsevier B.V.: 72–85. doi:10.1016/j.jconrel.2014.07.049.
- Meh, David A., Kevin R. Siebenlist, and Michael W. Mosesson. 1996. "Identification and Characterization of the Thrombin Binding Sites on Fibrin." *Journal of Biological Chemistry* 271 (38): 23121–25. doi:10.1074/jbc.271.38.23121.
- Mehra, Neelesh Kumar, and Srinath Palakurthi. 2016. "Interactions between Carbon Nanotubes and Bioactives: A Drug Delivery Perspective." *Drug Discovery Today* 21 (4). Elsevier Ltd: 585–97. doi:10.1016/j.drudis.2015.11.011.
- Meredith, Ann Marie, and Crispin R. Dass. 2016. "Increasing Role of the Cancer Chemotherapeutic Doxorubicin in Cellular Metabolism." *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 68 (6): 729–41. doi:10.1111/jphp.12539.
- Milane, Lara, Shanthi Ganesh, Shruti Shah, Zhen Feng Duan, and Mansoor Amiji. 2011. "Multi-Modal Strategies for Overcoming Tumor Drug Resistance: Hypoxia, the Warburg Effect, Stem Cells, and Multifunctional Nanotechnology." *Journal of Controlled Release* 155 (2). Elsevier B.V.: 237–47. doi:10.1016/j.jconrel.2011.03.032.

- Mirabile, Marco, Fabio Boccuni, Diana Gagliardi, Bruna Maria Rondinone, and Sergio Iavicoli. 2014. "Workplace Exposure to Engineered Nanomaterials: The Italian Path for the Definition of Occupational Health and Safety Policies." *Health Policy* 117 (1). Elsevier Ireland Ltd: 128–34. doi:10.1016/j.healthpol.2014.01.020.
- Mohan, Praveena, and Natalya Rapoport. 2010. "Doxorubicin as a Molecular Nanotheranostic Agent: Effect of Doxorubicin Encapsulation in Micelles or Nanoemulsions on the Ultrasound-Mediated Intracellular Delivery and Nuclear Trafficking." *Molecular Pharmaceutics* 7 (6): 1959–73. doi:10.1021/mp100269f.
- Mosmann, Tim. 1983. "Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays." *Journal of Immunological Methods* 65 (1–2): 55–63. doi:10.1016/0022-1759(83)90303-4.
- Müller, Sylke. 2015. "Role and Regulation of Glutathione Metabolism in Plasmodium Falciparum." *Molecules* 20 (6): 10511–34. doi:10.3390/molecules200610511.
- Nadesh, Ragima, Dhanya Narayanan, Sreerekha P.r., Sajini Vadakumpully, Ullas Mony, Manzoor Koyakkutty, Shantikumar V. Nair, and Deepthy Menon. 2013. "Hematotoxicological Analysis of Surface-Modified and -Unmodified Chitosan Nanoparticles." *Journal of Biomedical Materials Research - Part A* 101 (10): 2957–66. doi:10.1002/jbm.a.34591.
- Nardo, Luca, Francesca Re, Simone Brioschi, Emanuela Cazzaniga, Antonina Orlando, Stefania Minniti, Marco Lamperti, et al. 2016. "Fluorimetric Detection of the Earliest Events in Amyloid ?? Oligomerization and Its Inhibition by Pharmacologically Active Liposomes." *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* 1860 (4). Elsevier B.V.: 746–56. doi:10.1016/j.bbagen.2016.01.003.
- Nehoff, Hayley, Neha N. Parayath, Laura Domanovitch, Sebastien Taurin, and Khaled Greish. 2014. "Nanomedicine for Drug Targeting: Strategies beyond the Enhanced Permeability and Retention Effect." *International Journal of Nanomedicine* 9 (1): 2539–55. doi:10.2147/IJN.S47129.

- Oh, Seung Soo, Bongjae F. Lee, Frank A. Leibfarth, Michael Eisenstein, Maxwell J. Robb, Nathaniel A. Lynd, Craig J. Hawker, and H. Tom Soh. 2014. "Synthetic Aptamer-Polymer Hybrid Constructs for Programmed Drug Delivery into Specific Target Cells." *Journal of the American Chemical Society* 136 (42): 15010–15. doi:10.1021/ja5079464.
- Orive, Gorka, Susan K. Tam, José Luis Pedraz, and Jean Pierre Hallé. 2006. "Biocompatibility of Alginate-Poly-L-Lysine Microcapsules for Cell Therapy." *Biomaterials* 27 (20): 3691–3700. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.02.048.
- Ota, David M. 2003. "What's New in General Surgery: Surgical Oncology." *Journal of the American College of Surgeons* 196 (6): 926–32. doi:10.1016/S1072-7515(03)00296-5.
- Pan, Tai Long, Pei Wen Wang, Saleh A. Al-Suwayeh, Yi Ju Huang, and Jia You Fang. 2012. "Toxicological Effects of Cationic Nanobubbles on the Liver and Kidneys: Biomarkers for Predicting the Risk." *Food and Chemical Toxicology* 50 (11). Elsevier Ltd: 3892–3901. doi:10.1016/j.fct.2012.07.005.
- Pandurangan, Muthuraman, and Doo Hwan Kim. 2015. "ZnO Nanoparticles Augment ALT, AST, ALP and LDH Expressions in C2C12 Cells." *Saudi Journal of Biological Sciences* 22 (6). King Saud University: 679–84. doi:10.1016/j.sjbs.2015.03.013.
- Paniccia, Rita, Raffaella Priora, Agatina Alessandrello Liotta, and Rosanna Abbate. 2015. "Platelet Function Tests: A Comparative Review." *Vascular Health and Risk Management* 11: 133–48. doi:10.2147/VHRM.S44469.
- Panyam, Jayanth, Sanjeeb K. Sahoo, Swayam Prabha, Tom Bargar, and Vinod Labhasetwar. 2003. "Fluorescence and Electron Microscopy Probes for Cellular and Tissue Uptake of poly(D,L-Lactide-Co-Glycolide) Nanoparticles." *International Journal of Pharmaceutics* 262 (1–2): 1–11. doi:10.1016/S0378-5173(03)00295-3.
- Papac, Rose J. 2001. "Origins of Cancer Therapy." *Yale Journal of Biology and Medicine* 74 (6): 391–98. doi:10.1038/onc.2009.347.

- Patnaik, M. M., and Stephan Moll. 2008. "Inherited Antithrombin Deficiency: A Review." *Haemophilia* 14 (6): 1229–39. doi:10.1111/j.1365-2516.2008.01830.x.
- Patra, Abhijeet, Tao Ding, Gokce Engudar, Yi Wang, Michal Marcin Dykas, Bo Liedberg, James Chen Yong Kah, Thirumalai Venkatesan, and Chester Lee Drum. 2016. "Component-Specific Analysis of Plasma Protein Corona Formation on Gold Nanoparticles Using Multiplexed Surface Plasmon Resonance." *Small* 12 (9): 1174–82. doi:10.1002/sml.201501603.
- Pérez, Elena, Rosa Olmo, César Teijón, Enriqueta Muñiz, Nuria Montero, Jose M. Teijón, and M. Dolores Blanco. 2015. "Biocompatibility Evaluation of pH and Glutathione-Responsive Nanohydrogels after Intravenous Administration." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 136: 222–31. doi:10.1016/j.colsurfb.2015.09.017.
- Philipsen, Jens Peter, and Kirsten Vikkelsø Madsen. 2015. "Hypo- and Hypernatremia Results in Inaccurate Erythrocyte Mean Corpuscular Volume Measurement in Vitro, When Using Sysmex XE 2100." *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* m. doi:10.3109/00365513.2015.1062534.
- Pi, Jiang, Hua Jin, Ruiying Liu, Bing Song, Qing Wu, Li Liu, Jinhuan Jiang, Fen Yang, Huaihong Cai, and Jiye Cai. 2013. "Pathway of Cytotoxicity Induced by Folic Acid Modified Selenium Nanoparticles in MCF-7 Cells." *Applied Microbiology and Biotechnology* 97 (3): 1051–62. doi:10.1007/s00253-012-4359-7.
- Pinhel, Isabel, Margaret Hills, Suzanne Drury, Janine Salter, Georges Sumo, Roger A'Hern, Judith M Bliss, et al. 2012. "ER and HER2 Expression Are Positively Correlated in HER2 Non-Overexpressing Breast Cancer." *Breast Cancer Research : BCR* 14 (2): R46. doi:10.1186/bcr3145.
- Podduturi, Vishwa Priya, Isidro B. Magaña, D. Patrick O'Neal, and Pedro A. Derosa. 2013. "Simulation of Transport and Extravasation of Nanoparticles in Tumors Which Exhibit Enhanced Permeability and Retention Effect." *Computer Methods and Programs in Biomedicine* 112 (1): 58–68. doi:10.1016/j.cmpb.2013.06.011.

- Powell, David, Sruti Chandra, Kyra Dodson, Farhana Shaheen, Kylar Wilt, Shubha Ireland, Muniruzzaman Syed, Srikanta Dash, and Thomas Wiese. 2017. "Aptamer-Functionalized Hybrid Nanoparticle for the Treatment of Breast Cancer." *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 114 (2017). Elsevier B.V.: 108–18. doi:10.1016/j.ejpb.2017.01.011.
- Prat, Aleix, Estela Pineda, Barbara Adamo, Patricia Galv??n, Aranzazu Fern??ndez, Lydia Gaba, Marc D??ez, Margarita Viladot, Ana Arance, and Montserrat Mu??oz. 2015. "Clinical Implications of the Intrinsic Molecular Subtypes of Breast Cancer." *Breast* 24: S26–35. doi:10.1016/j.breast.2015.07.008.
- Pujari-Palmer, Shiuli, Song Chen, Stefano Rubino, Hong Weng, Wei Xia, Håkan Engqvist, Liping Tang, and Marjam Karlsson Ott. 2016. "In Vivo and in Vitro Evaluation of Hydroxyapatite Nanoparticle Morphology on the Acute Inflammatory Response." *Biomaterials* 90: 1–11. doi:10.1016/j.biomaterials.2016.02.039.
- Qi, Huimin, Xiaolei Liu, Kai Wang, Dongmei Liu, Liye Huang, Shunmei Liu, and Quanbin Zhang. 2013. "Subchronic Toxicity Study of Ulvan from *Ulva Pertusa* (Chlorophyta) in Wistar Rats." *Food and Chemical Toxicology* 62. Elsevier Ltd: 573–78. doi:10.1016/j.fct.2013.09.022.
- Qi, Jianing, Ping Yao, Fen He, Chuiliang Yu, and Chong Huang. 2010. "Nanoparticles with Dextran/chitosan Shell and BSA/chitosan Core-Doxorubicin Loading and Delivery." *International Journal of Pharmaceutics* 393 (1–2). Elsevier B.V.: 177–85. doi:10.1016/j.ijpharm.2010.03.063.
- Qiao, Juan, Ping Dong, Xiaoyu Mu, Li Qi, and Ran Xiao. 2016. "Folic Acid-Conjugated Fluorescent Polymer for up-Regulation Folate Receptor Expression Study via Targeted Imaging of Tumor Cells." *Biosensors and Bioelectronics* 78: 147–53. doi:10.1016/j.bios.2015.11.021.
- Rafiyath, Shamudheen M, Mohammad Rasul, Byung Lee, Guoqing Wei, Gurpreet Lamba, and Delong Liu. 2012. "Comparison of Safety and Toxicity of Liposomal Doxorubicin vs. Conventional Anthracyclines: A Meta-Analysis." *Experimental Hematology & Oncology* 1 (1): 10. doi:10.1186/2162-3619-1-10.

- Ranucci, M. 2002. "Antithrombin III Key Factor in Extracorporeal Circulation." *Minerva Anesthesiol* 68: 454–57.
- Rao, S. B., and C. P. Sharma. 1997. "Use of Chitosan as a Biomaterial: Studies on Its Safety and Hemostatic Potential." *Journal of Biomedical Materials Research* 34 (1): 21–28. doi:10.1002/(SICI)1097-4636(199701)34:1<21::AID-JBM4>3.0.CO;2-P.
- Rowland, Andrew, Mafalda M. Dias, Michael D. Wiese, Ganessan Kichenadasse, Ross A. McKinnon, Christos S. Karapetis, and Michael J. Sorich. 2016. "Meta-Analysis Comparing the Efficacy of Anti-EGFR Monoclonal Antibody Therapy between KRAS G13D and Other KRAS Mutant Metastatic Colorectal Cancer Tumours." *European Journal of Cancer* 55. Elsevier Ltd: 122–30. doi:10.1016/j.ejca.2015.11.025.
- Rozga, Jacek, Tomasz Piątek, and Piotr Małkowski. 2013. "Human Albumin: Old, New, and Emerging Applications." *Annals of Transplantation: Quarterly of the Polish Transplantation Society* 18: 205–17. doi:10.12659/AOT.889188.
- Sahib, Ahmed. 2016. "Antidiabetic and Antioxidant Effect of Cinnamon in Poorly Controlled Type-2 Diabetic Iraqi Patients: A Randomized, Placebo-Controlled Clinical Trial." *Journal of Intercultural Ethnopharmacology* 5 (2): 108. doi:10.5455/jice.20160217044511.
- Sajid, Muhammad Imran, Usama Jamshaid, Talha Jamshaid, Nadiah Zafar, H. Fessi, and Abdelhamid Elaissari. 2016. "Carbon Nanotubes from Synthesis to in Vivo Biomedical Applications." *International Journal of Pharmaceutics* 501 (1–2). Elsevier B.V.: 278–99. doi:10.1016/j.ijpharm.2016.01.064.
- Sakai-Kato, Kumiko, Eiko Saito, Keiko Ishikura, and Toru Kawanishi. 2010. "Analysis of Intracellular Doxorubicin and Its Metabolites by Ultra-High-Performance Liquid Chromatography." *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 878 (19). Elsevier B.V.: 1466–70. doi:10.1016/j.jchromb.2010.03.040.
- Santen, Richard J., Wei Yue, and Ji Ping Wang. 2015. "Estrogen Metabolites and Breast

- Cancer." *Steroids*. doi:10.1016/j.steroids.2014.08.003.
- Saraswat, Mukesh, and K. V. Arya. 2014. "Feature Selection and Classification of Leukocytes Using Random Forest." *Medical & Biological Engineering & Computing* 52 (12): 1041–52. doi:10.1007/s11517-014-1200-8.
- Satalkar, Priya, Bernice Simone Elger, and David M. Shaw. 2016. "Defining Nano, Nanotechnology and Nanomedicine: Why Should It Matter?" *Science and Engineering Ethics* 22 (5). Springer Netherlands: 1255–76. doi:10.1007/s11948-015-9705-6.
- Sharma, Ashok Kumar, Avinash Gothwal, Prashant Kesharwani, Hashem Alsaab, Arun K. Iyer, and Umesh Gupta. 2016. "Dendrimer Nanoarchitectures for Cancer Diagnosis and Anticancer Drug Delivery." *Drug Discovery Today* 0 (0). Elsevier Ltd: 314–26. doi:10.1016/j.drudis.2016.09.013.
- Shi, Chunmeng, Ying Zhu, Xinze Ran, Meng Wang, Yongping Su, and Tianmin Cheng. 2006. "Therapeutic Potential of Chitosan and Its Derivatives in Regenerative Medicine." *The Journal of Surgical Research* 133 (2): 185–92. doi:10.1016/j.jss.2005.12.013.
- Shim, Gi seong, Sarala Manandhar, Dong ha Shin, Tae Hyoung Kim, and Mi Kyoung Kwak. 2009. "Acquisition of Doxorubicin Resistance in Ovarian Carcinoma Cells Accompanies Activation of the NRF2 Pathway." *Free Radical Biology and Medicine* 47 (11). Elsevier Inc.: 1619–31. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2009.09.006.
- Singh, J, K Jain, N K Mehra, and N K Jain. 2016. "Dendrimers in Anticancer Drug Delivery: Mechanism of Interaction of Drug and Dendrimers." *Artif Cells Nanomed Biotechnol* 1401 (September): 1–9. doi:10.3109/21691401.2015.1129625.
- Spector, Arthur A. 1975. "Fatty Acid Binding to Plasma Albumin." *Journal of Lipid Research* 16 (3): 165–79.
- Srinivasa, P.C., and R.N. Tharanathan. 2007. "Chitin/Chitosan — Safe, Ecofriendly Packaging Materials with Multiple Potential Uses." *Food Reviews International* 23 (1): 53–72. doi:10.1080/87559120600998163.



- Stickles, Xiaomang B., Douglas C. Marchion, Elona Bicaku, Entidhar Al Sawah, Forough Abbasi, Yin Xiong, Nadim Bou Zgheib, et al. 2015. "BAD-Mediated Apoptotic Pathway Is Associated with Human Cancer Development." *International Journal of Molecular Medicine* 35 (4): 1081–87. doi:10.3892/ijmm.2015.2091.
- Stoltenburg, Regina, Christine Reinemann, and Beate Strehlitz. 2007. "SELEX-A (R)evolutionary Method to Generate High-Affinity Nucleic Acid Ligands." *Biomolecular Engineering*. doi:10.1016/j.bioeng.2007.06.001.
- Stynes, Gil, George K. Kiroff, Wayne A J Morrison, and Mark A. Kirkland. 2008. "Tissue Compatibility of Biomaterials: Benefits and Problems of Skin Biointegration." *ANZ Journal of Surgery* 78 (8): 654–59. doi:10.1111/j.1445-2197.2008.04609.x.
- Sugio, S, a Kashima, S Mochizuki, M Noda, and K Kobayashi. 1999. "Crystal Structure of Human Serum Albumin at 2.5 Å Resolution." *Protein Engineering* 12 (6): 439–46. doi:10.1093/protein/12.6.439.
- Sweeney, Aldrin E. 2015. "Nanomedicine Concepts in the General Medical Curriculum: Initiating a Discussion." *International Journal of Nanomedicine* 10: 7319–31. doi:10.2147/IJN.S96480.
- Synowiecki, Józef, and Nadia Ali Al-Khateeb. 2003. "Production, Properties, and Some New Applications of Chitin and Its Derivatives." *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 43 (2): 145–71. doi:10.1080/10408690390826473.
- Szabo, Peter, and Romana Zelko. 2015. "Formulation and Stability Aspects of Nanosized Solid Drug Delivery Systems." *Current Pharmaceutical Design* 21 (22): 3148–57. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26027571>.
- Taghipour, B., M. Yakhchali, I. Haririan, A. M. Tamaddon, and S. Mohammadi Samani. 2014. "The Effects of Technical and Compositional Variables on the Size and Release Profile of Bovine Serum Albumin from PLGA Based Particulate Systems." *Research in Pharmaceutical Sciences*.

- Talevi, Alan, Melisa E Gantner, and María E Ruiz. 2014. "Applications of Nanosystems to Anticancer Drug Therapy (Part I. Nanogels, Nanospheres, Nanocapsules)." *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery* 9 (1): 83–98. doi:10.2174/1574891X113089990038.
- Taylor, C. W., and A. M. Kirby. 2015. "Cardiac Side-Effects From Breast Cancer Radiotherapy." *Clinical Oncology* 27 (11): 621–29. doi:10.1016/j.clon.2015.06.007.
- Terada, Satoshi, Taeko Nishimura, Masahiro Sasaki, Hideyuki Yamada, and Masao Miki. 2003. "Sericin, a Protein Derived from Silkworms, Accelerates the Proliferation of Several Mammalian Cell Lines Including a Hybridoma." In *Cytotechnology*, 40:3–12. doi:10.1023/A:1023993400608.
- Theodoulou, Frederica, and Ian Kerr. 2015. "ABC Transporter Research: Going Strong 40 Years On." *Biochemical Society Transactions* 43 (5): 1033–40. doi:10.1042/BST20150139.
- Tiwari, Dhermendra K, Takashi Jin, and J Behari. 2011a. "Dose-Dependent in-Vivo Toxicity Assessment of Silver Nanoparticle in Wistar Rats." *Toxicology Mechanisms and Methods* 21 (1): 13–24. doi:10.3109/15376516.2010.529184.
- . 2011b. "Dose-Dependent in-Vivo Toxicity Assessment of Silver Nanoparticle in Wistar Rats." *Toxicology Mechanisms and Methods*. doi:10.3109/15376516.2010.529184.
- Tripodi, A., S. H. Caldwell, M. Hoffman, J. F. Trotter, and A. J. Sanyal. 2007. "Review Article: The Prothrombin Time Test as a Measure of Bleeding Risk and Prognosis in Liver Disease." *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 26 (2): 141–48. doi:10.1111/j.1365-2036.2007.03369.x.
- Tse, Brian Wan-Chi, Gary J Cowin, Carolina Soekmadji, Lidija Jovanovic, Raja S Vasireddy, Ming-Tat Ling, Aparajita Khatri, Tianqing Liu, Benjamin Thierry, and Pamela J Russell. 2014. "PSMA-Targeting Iron Oxide Magnetic Nanoparticles Enhance MRI of Preclinical Prostate Cancer." *Nanomedicine (London, England)* 10: 1–12.

doi:10.2217/nnm.14.122.

Uhrich, Kathryn E, Scott M Cannizzaro, Robert S Langer, and Kevin M Shakesheff. 1999. "Polymeric Systems for Controlled Drug Release." *Chemical Reviews* 99 (DECEMBER 1999): 3181–98. doi:10.1021/cr940351u.

Ul Ahad, Inam, Andrzej Bartnik, Henryk Fiedorowicz, Jerzy Kostecki, Barbara Korczyc, Tomasz Ciach, and Dermot Brabazon. 2014. "Surface Modification of Polymers for Biocompatibility via Exposure to Extreme Ultraviolet Radiation." *Journal of Biomedical Materials Research - Part A* 102 (9): 3298–3310. doi:10.1002/jbm.a.34958.

Usov, Anatolii I. 2011. "Polysaccharides of the Red Algae." *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry* 65: 115–217. doi:10.1016/B978-0-12-385520-6.00004-2.

Uttley, Lesley, Becky L. Whiteman, Helen Buckley Woods, Susan Harnan, Sian Taylor Philips, and Ian A. Cree. 2016. "Building the Evidence Base of Blood-Based Biomarkers for Early Detection of Cancer: A Rapid Systematic Mapping Review." *EBioMedicine* 10. The Authors: 164–73. doi:10.1016/j.ebiom.2016.07.004.

Uzbekov, M G. 2012. "Effects of Fatty Acids on Human Serum Albumin Binding Centers" 153 (3): 323–26.

Vilorio-Marqués, Laura, Antonio José Molina, Cristina Díez-Tascón, Begoña Álvarez-Cuenllas, Concepción Álvarez-Cañas, Mercedes Hernando-Martín, Tania Fernández-Villa, Tomás Elosua, and Vicente Martín. 2015. "Características Clínicas, Anatomopatológicas Y Moleculares En Casos de Cáncer Colorrectal Según Localización Tumoral Y Grado de Diferenciación." *Revista Colombiana de Cancerología* 19 (4). doi:10.1016/j.rccan.2015.06.002.

Volkov, Yuri. 2015. "Quantum Dots in Nanomedicine: Recent Trends, Advances and Unresolved Issues." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 468 (3). Elsevier: 419–27. doi:10.1016/j.bbrc.2015.07.039.

- Wang, Yu Cai, Feng Wang, Tian Meng Sun, and Jun Wang. 2011. "Redox-Responsive Nanoparticles from the Single Disulfide Bond-Bridged Block Copolymer as Drug Carriers for Overcoming Multidrug Resistance in Cancer Cells." *Bioconjugate Chemistry* 22 (10): 1939–45. doi:10.1021/bc200139n.
- Wang, Zongwei, Charlotta Dabrosin, Xin Yin, Mark M. Fuster, Alexandra Arreola, W. Kimryn Rathmell, Daniele Generali, et al. 2015. "Broad Targeting of Angiogenesis for Cancer Prevention and Therapy." *Seminars in Cancer Biology* 35. Elsevier Ltd: S224–43. doi:10.1016/j.semcancer.2015.01.001.
- Waterfield, Catherine J., John A. Turton, M. David C Scales, and John A. Timbrell. 1991. "Taurine, a Possible Urinary Marker of Liver Damage: A Study of Taurine Excretion in Carbon Tetrachloride-Treated Rats." *Archives of Toxicology* 65 (7): 548–55. doi:10.1007/BF01973715.
- Wijeratne, Peter A., Vasileios Vavourakis, John H. Hipwell, Chrysovalantis Voutouri, Panagiotis Papageorgis, Triantafyllos Stylianopoulos, Andrew Evans, and David J. Hawkes. 2016. "Multiscale Modelling of Solid Tumour Growth: The Effect of Collagen Micromechanics." *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology* 15 (5). Springer Berlin Heidelberg: 1079–90. doi:10.1007/s10237-015-0745-2.
- Williams, David F. 2009. "On the Nature of Biomaterials." *Biomaterials* 30 (30). Elsevier Ltd: 5897–5909. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.07.027.
- Wolford, S T, R a Schroer, F X Gohs, P P Gallo, M Brodeck, H B Falk, and R Ruhren. 1986. "Reference Range Data Base for Serum Chemistry and Hematology Values in Laboratory Animals." *Journal of Toxicology and Environmental Health* 18 (February 2015): 161–88. doi:10.1080/15287398609530859.
- Wosikowski, K, J T Regis, R W Robey, M Alvarez, J T Buters, J M Gudas, and S E Bates. 1995. "Normal p53 Status and Function despite the Development of Drug Resistance in Human Breast Cancer Cells." *Cell Growth Differ* 6 (11): 1395–1403.
- Xu, Jiaojiao, Beihua Xu, Dan Shou, Fuhua Qin, Yong Xu, and Ying Hu. 2016.

- "Characterization and Evaluation of a Folic Acid Receptor-Targeted Cyclodextrin Complex as an Anticancer Drug Delivery System." *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 83. Elsevier B.V.: 132–42. doi:10.1016/j.ejps.2015.11.008.
- Xu, Shangjie, Ying Luo, Ralph Graeser, André Warnecke, Felix Kratz, Peter Hauff, Kai Licha, and Rainer Haag. 2009. "Development of pH-Responsive Core-Shell Nanocarriers for Delivery of Therapeutic and Diagnostic Agents." *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 19 (3): 1030–34. doi:10.1016/j.bmcl.2008.01.043.
- Yang, Tongren, Lin Hao, Sufei Yao, Yuanyuan Zhao, Wenjing Lu, and Kai Xiao. 2016. "TabHLH1, a bHLH-Type Transcription Factor Gene in Wheat, Improves Plant Tolerance to Pi and N Deprivation via Regulation of Nutrient Transporter Gene Transcription and ROS Homeostasis." *Plant Physiology and Biochemistry* 104. Elsevier Masson SAS: 99–113. doi:10.1016/j.plaphy.2016.03.023.
- Zhang, Liangke, Shixiang Hou, Shengjun Mao, Dapeng Wei, Xiangrong Song, and Yi Lu. 2004. "Uptake of Folate-Conjugated Albumin Nanoparticles to the SKOV3 Cells." *International Journal of Pharmaceutics* 287 (1–2): 155–62. doi:10.1016/j.ijpharm.2004.08.015.
- Zhao, Yong, Ro Dong Park, and Riccardo A A Muzzarelli. 2010. "Chitin Deacetylases: Properties and Applications." *Marine Drugs*. doi:10.3390/md8010024.
- Zhao, Yujie, and Alex A Adjei. 2015. "Targeting Angiogenesis in Cancer Therapy: Moving Beyond Vascular Endothelial Growth Factor." *The Oncologist* 20 (6): 660–73. doi:10.1634/theoncologist.2014-0465.
- Zorov, Dmitry B., Magdalena Juhaszova, and Steven J. Sollott. 2014. "Mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS) and ROS-Induced ROS Release." *Physiological Reviews* 94 (3): 909–950. doi:10.1152/physrev.00026.2013.